

**A TOLL-SZERŰ RECEPTOROK, VALAMINT A
DOHÁNYFÜST ÖSSZETEVŐI ÁLTAL KIVÁLTOTT
FUNKCIÓZAVAROK MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSAI
AGYI ENDOTÉLSEJTEKBEN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

NAGYŐSZI PÉTER

Témavezető:

Dr. Krizbai István

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológia Központ
Biofizikai Intézet
Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium

SZEGED

2010

Nagyszüleim és Dr. Villányi János emlékének.

„Az anyag csak önmagában nem létezik. Minden anyag csak egy bizonyos erő által keletkezik és létezik, amely erő az atomrészecskéket rezgésbe hozza, és azt az atom legparányibb naprendszereként összetartja. De mivel a világűrben sem egy intelligens sem pedig egy örök erő nem létezik, azt kell feltételeznünk, hogy e mögött az erő mögött egy intelligens szellem létezik.”

Max Planck

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	6
BEVEZETÉS.....	10
<i>Központi idegrendszeri határfelületek</i>	10
<i>A vér-agy gát felfedezésének rövid története</i>	11
<i>A vér-agy gát szerkezete</i>	12
<i>Anyagtranszport a vér-agy gáton keresztül</i>	15
<i>Az agyi endotélsejtek közti kapcsolatok</i>	16
<i>A szoros kapcsolatok</i>	16
<i>Az adherens kapcsolatok</i>	18
<i>A Toll-szerű receptorok</i>	21
<i>TLR ligandok és jeltovábbító útvonalak</i>	23
<i>Endogén TLR ligandok</i>	24
<i>A dohányzás élettani hatásai</i>	26
<i>A dohányfüst összetevői és az endotélsejtekre kifejtett károsító hatásai</i>	27
CÉLKITŰZÉSEK.....	31
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	32
<i>Vegyszerek és antitestek</i>	32
<i>Sejtenyésztés és kezelések</i>	32
<i>Permeabilitás mérések</i>	33
<i>A transzendoteliális elektromos ellenállás mérése</i>	34
<i>Valós idejű polimeráz láncreakció</i>	35
<i>A fehérjeminták előkészítése és Western blot</i>	36
<i>Immunkicsapás</i>	37
<i>Immunfluoreszcens festés</i>	37
<i>Statisztikai elemzés</i>	38
KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	39
<i>Az agyi endotélsejtek Toll-szerű receptorainak vizsgálata</i>	39
<i>A Toll-szerű receptorok kifejeződése az agyi endotélsejteken</i>	39
<i>Stresszfaktorok hatásai az endoteliális Toll-szerű receptorok transzkripciójára</i>	40
<i>A transzendoteliális permeabilitás változása zymosan hatására</i>	41
<i>A zymosan hatása a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésére</i>	42
<i>A zymosan és az oxidatív stressz együttes hatása a sejtkapcsoló fehérjékre</i>	43

<i>A sejtkapcsoló szerkezetek változásainak mechanizmusa</i>	44
<i>A zymosan hatása a sejtkapcsoló fehérjék elhelyezkedésére</i>	45
<i>A zymosan és az oxidatív stressz együttes hatása a sejtkapcsoló fehérjék eloszlására</i>	46
<i>A dohányfüst összetevőinek hatásai az agyi endotélsejtekre</i>	48
<i>A nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének hatásai az agyi endotélsejtek közötti kapcsolatokra.....</i>	48
<i>A sejtkapcsoló fehérjék sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata.....</i>	52
<i>Az endotélsejtek gát funkciójának vizsgálata a transzendenteliális elektromos ellenállás mérésével</i>	55
<i>A nikotin és az oxidatív stressz együttes hatása az agyi endotélsejtekre</i>	57
AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	59
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	68
IRODALOMJEGYZÉK.....	69
ÖSSZEFOGLALÓ.....	89
SUMMARY	92
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1-MA: 1-metilantracén (1-methylantracene)
ABC: ATP-kötő kazetta (ATP-binding cassette)
AJ: adherens kapcsolat (adherens junction)
AP-1: aktiváló fehérje 1 (activating protein-1)
BBB: vér-agy gát (blood-brain barrier)
BCA: bicinkoninsav (bicinchoninic acid)
BCRP: mellrák rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein)
bFGF: bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)
BLP: bakteriális lipoprotein (bacterial lipoprotein)
BSA: marha szérum albumin (bovine serum albumin)
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
CEC: agyi endotélsejt (cerebral endothelial cell)
cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát (cyclic guanosine monophosphate)
CINC-1: citokin-által indukált neutrofil kemoattraktáns 1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1)
CNS: központi idegrendszer (central nervous system)
CPT-cAMP: 8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfát (8- (4- Chloro-phenylthio) adenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate)
cPTK: citoplazmatikus protein tirozin kináz (cytoplasmatic protein kinase)
CSC: cigarettafüst kondenzátum (cigarette smoke condensate)
Cy3: karbocianin 3 (carbocyanine 3)
DMEM/F12: Dulbecco módosított Eagle tápfolyadék: F-12-es tápanyag keverék (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)
EBA: Evans kékkel jelölt albumin (Evans blue labeled albumin)
EBM-2: endoteliális alap tápfolyadék 2 (endothelial basal medium-2)
EGF: epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGM-2: endotélsejt növekedési tápfolyadék 2 (endothelial cell growth medium-2)
ELAM-1: endotél leukocita adhézións molekula 1 (endothelial leukocyte adhesion molecule 1)
ERK: extracelluláris szignál-szabályozta kináz (extracellular regulated kinase)
FITC: fluoreszcein izotiocianát (fluorescein isothiocyanate)

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)

GDNF: glia-sejtvonal eredetű neurotrófikus faktor (glial cell line-derived neurotrophic factor)

GK: guanilát kináz (guanylate kinase)

GLUT1: glükóz transzporter 1 (glucose transporter-1)

hCMEC/D3: humán agyi mikroér endotélsejtek, D3 klonális populáció (human cerebral microvascular endothelial cells, D3 clonal population)

HSP: hősokkfehérje (heat shock protein)

ICAM-1: intercelluláris adhéziós molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)

IL-1: interleukin-1

IRF7: interferon szabályozó faktor (interferon regulatory factor)

JACOP: junkcióhoz kapcsolódó csavart-csavar fehérje (junction-associated coiled-coil protein)

JAM: junkcionális adhéziós molekula (junctional adhesion molecule)

JEAP: junkcióban feldúsuló és kapcsolódó fehérje (junction enriched and associated protein)

JNK: c-Jun aminoterminális kináz (c-Jun N-terminal kinase)

LPS: lipopoliszacharid (lipopolysaccharide)

LTA: lipoteikolsav (lipoteichoic acid)

MAGI: fordított domén szerkezetű MAGUK fehérjék (MAGUKs with inverted domain structure)

MAGUK: membránhoz kapcsolódó guanilát kináz (membrane associated guanylate kinase)

MAL: MyD88 adapter-szerű (Myd88-adaptor-like)

MAPK: mitogén által aktivált fehérje kináz (mitogen activated protein kinase)

MASCOT: MAGI-1-hez kapcsolódó csavart-csavar szoros kapcsolat fehérje (MAGI-1-associated coiled-coil tight junction protein)

MRP: multidrog rezisztencia fehérje (multidrug resistance protein)

MUPP1: multi-PDZ domén fehérje 1 (multi-PDZ domain protein 1)

MyD88: myeloid differenciáció 88 (myeloid differentiation 88)

nAchr: nikotinos acetilkolin receptor (nicotinic acetylcholine receptor)

NF-κB: nukleáris faktor kappa B (nuclear factor-κB)

NO: nitrogén-monoxid (nitrogen monoxide)

NOD: nukleotid kötő oligomerizációs domén (nucleotide-binding oligomerization domain)

OVL: organum vasculosum laminae terminalis

PA: fenantrén (phenanthrene)

PAH: policiklusos aromás szénhidrogén (polycyclic aromatic hydrocarbon)

PAI-1: plazminogén aktivátor gátló 1 (plasminogen activator inhibitor-1)

PAMP: kórokozóhoz kapcsolódó molekuláris mintázat (pathogen-associated molecular pattern)

PDS: foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)

PDTC: pirrolidin ditiokarbamát (pyrrolidine dithiocarbamate)

PDZ: PSD95-DlgA-ZO-1

PECAM-1: vérlemezke endotél sejtheadhéziós molekula 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1)

PGN: peptidoglikán (peptidoglycan)

Pgp: P-glikoprotein (P-glycoprotein)

PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz (phosphatidylinositol-3 kinase)

PKC: protein kináz C (protein kinase C)

PLA2: foszfolipáz A2 (phospholipase A2)

PRR: mintázafelismerő receptor (pattern recognition receptor)

PVDF: polivinildén fluorid (polyvinylidene fluoride)

RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció (real-time polymerase chain reaction)

RTK: receptor tirozin kináz (receptor tyrosine kinase)

SARM: steril α - és armadillo-motívumot tartalmazó fehérje (sterile α - and armadillo-motif containing protein)

SF: nátrium fluoreszcein (sodium fluorescein)

SH-3: SRC homológ 3 (SRC Homology 3)

SRC: szarkóma (sarcoma)

TAT: a transzkripció transzaktivátora (trans-activator of transcription)

TBS: Trissel pufferelt sóoldat (Tris buffered saline)

TEER: transzendenteliális elektromos ellenállás (transendothelial electrical resistance)

TGF- β : transzformáló növekedési faktor-béta (transforming growth factor-beta)

TIR: Toll/IL-1

TJ: szoros kapcsolat (tight junction)

TLR: Toll-szerű receptorok (Toll-like receptor)

TNF: tumor nekrosis faktor (tumor necrosis factor)

TRAM: TRIF-hez kapcsolódó adapter molekula (TRIF-related adaptor molecule)

TRIF: IFN β -t indukáló TIR-domént tartalmazó adapter fehérje (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β)

VCAM-1: vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)

VE: vaszkuláris endoteliális (vascular endothelial)

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

ZO: zonula occludens

BEVEZETÉS

A központi idegrendszeri homeosztázis biztosítása

Agyunk élettani működéséhez elengedhetetlen a homeosztázis, azaz az állandó belső környezet biztosítása. Testünk egyéb részeiben gyakran előfordul különböző ionok, aminosavak, hormonok és számos más anyag sejten kívüli koncentrációjának kismértékű ingadozása, különösen táplálkozás vagy fizikai munkavégzés során. Agyunkban azonban az effajta ingadozás szabályozatlan idegi tevékenységet eredményezhetne, ezért a központi idegrendszert meg kell védeni a vér összetételének átmeneti ingadozásaitól. A központi idegrendszerben az idegsejtek kommunikációja kémiai és elektromos jelek kombinációjával történik, és a szinapszisok lokális mikrokörnyezetének precíz szabályozása kritikus pontja a megbízható neuronális jeltovábbításnak. A jelenlegi elméletek szerint ez lehetett az egyik fő evolúciós hajtóerő, ami az idegi mikrokörnyezet homeosztázisának fenntartását biztosító mechanizmusok kialakulásához vezetett (Abbott, 1992).

Központi idegrendszeri határfelületek

A központi idegrendszeri homeosztázis fenntartásában szerepet játszó szerkezetek közül messze a vér-agy gát határfelülete a legnagyobb. Az agyi kapillárisok endotélsejtjei által képezett felszín körülbelül $150\text{--}200\text{ cm}^2$ egy gramm agyszövetben, így a gát teljes felülete az átlagos felnőtt emberi agyban körülbelül $12\text{--}18\text{ m}^2$ (Abbott és mtsai, 2010). A vér-cerebrospinalis folyadék gát felszíne ennél hozzávetőlegesen ötezerszer kisebb. Ez utóbbi határfelületet a plexus choroideus epitélsejtjei képezik, amelyek a 3. és a 4. agykamrában, valamint az oldalkamrákban találhatók. A plexus choroideus epitéliuma által kiválasztott agy-gerincvelői folyadék (liquor cerebrospinalis) az agykamrákból a kemény (dura mater) és a lágy agyhártya (pia mater) közötti térbe áramlik. A dura alatt a pókhálóhártya (arachnoidea) epitéliuma által képezett határfelület alkotja a harmadik gátat, amely teljesen körbeveszi az agyat (Abbott és mtsai, 2005).

Az egyes neuronok nagyjából $8\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$ távolságra vannak a kapillárisoktól (Schlageter és mtsai, 1999), míg az agy-gerincvelői folyadéktól való távolságuk milliméteres és centiméteres nagyságrendű is lehet. Emiatt a központi idegrendszeri gátak

közül az agyi sejtek közvetlen mikrokörnyezetének szabályozásában a vér-agy gát szerepe a leginkább meghatározó.

A vér-agy gát felfedezésének rövid története

A vér-agy gátról alkotott mai ismeretünk több mint száz év kutatómunkájának eredménye. Egy, a keringést és a központi idegrendszert egymástól elválasztó gát létezésére utaló első kísérletet Paul Ehrlich német bakteriológus végezte el 1895-ben. Kisebb állatokba intravénásan festéket juttatva megfigyelte, hogy az összes szerv megfestődött, az agyat kivéve. E jelenséget úgy értelmezte, hogy a központi idegrendszer affinitása a festékhez sokkal kisebb, mint a többi szervé. Ehrlich e kezdeti elgondolása azonban tévesnek bizonyult, ezt saját tanítványa, Edwin E. Goldmann bizonyította be 1913-ban. Goldmann a tripánkéék nevű festéket közvetlenül nyulak és kutyák agygerincvelői folyadékába fecskendezve azt tapasztalta, hogy az állatok egész agya azonnal megfestődött, viszont a többi szervük festetlen maradt. Kísérletei révén Goldmann jutott el először ahhoz megállapításhoz, hogy a központi idegrendszert valami elszigeteli a véráramtól. Ezen szigetelő rendszert Bluthirnschranke, azaz vér-agy gát névvel először Lewandowsky illette 1900-ban, miközben a nátrium-ferrocianid központi idegrendszerbe történő korlátozott bejutását tanulmányozta (Goldstein és Betz, 1986).

Miután a gát létét kétséget kizáróan sikerült bizonyítani, a következő kérdés finomszerkezetének meghatározása volt. Ehhez azonban szükség volt a képalkotó technika fejlődésére is, ugyanis az 1900-as évek elején még nem voltak olyan módszerek, amelyekkel az agyi ereket részleteiben lehetett vizsgálni. Az 1950-es években kezdődött meg az agyi hajszálerek elektronmikroszkópos vizsgálata. Azt figyelték meg, hogy a mikroerek falának endotélsejtjei egyetlen rétegben helyezkednek el, hozzájuk pedig periciták kapcsolódnak. E két sejtípust körülveszi a bazális membrán és a kapillárisokat szorosan burkolják asztrocita végtalpak is. Ez utóbbi jelenség miatt kezdetben úgy vélték, hogy a gát kialakításában az asztrocitáké a fő szerep. Az 1960-as években az elektronmikroszkóppal követhető nyomjelző molekulák felfedezése nagymértékben segítette a vér-agy gát működésének tisztázását. Reese és Karnovsky (1967) a korai tripánkéés kísérleteket torna-peroxidázzal megismételve megfigyelte, hogy a keringési rendszerbe juttatott jelölőanyag nem jutott át az agyi hajszálereken. 1969-ben aztán Reese Brightmannal együtt az előző kísérlet fordítottját is elvégezte, amely munka döntőnek bizonyult a gát anatómiai alapjának tisztázását illetően. Kimutatták ugyanis, hogy az

agykamrába fecskendezett torna peroxidáz az asztrocita végtalpak közötti réseken átdiffundálva eljutott egészen az endotélium abluminális felszínéig. Kiderült tehát, hogy a vér-agy gát kialakításában a döntő szerep nem az asztrocitáké, hanem az igen szorosan illeszkedő endotélsejteké.

A vér-agy gát szerkezete

Az agyi mikroerek endotélsejtjeinek szerkezete jelentősen különbözik a szervezet többi kapillárisáétól. A szomszédos sejtek folytonos szoros kapcsolatok (tight junction, TJ) kialakítása révén fizikailag összekapcsolódnak és ezáltal még a legkisebb átmérőjű ionok számára is fizikai akadályt képeznek. Az agyi kapillárisfal endotélsejtjei továbbá nem fenesztráltak, azaz a perifériás kapillárisok többségétől eltérően nem tartalmaznak pórusokat. A paracelluláris gáton, vagyis a sejtek közötti anyagáramlás megakadályozásán túl az endotélsejtekben igen kevés pinocitotikus vezikula található, az endocitózis és a transzcitózis is igen alacsony szintű (transzcelluláris gát). Az agyi endotélsejtek a perifériás endotélsejtekre nem jellemző enzimekkel is rendelkeznek, mint az acetilkolin észteráz, monoamin oxidázok vagy a γ -glutamil transzpeptidáz, amelyek a metabolikus gát kialakításában vesznek részt. Végezetül az endotélsejtek az idegi működés számára káros anyagokat efflux transzporterek révén tartják kívül, illetve távolítják el a központi idegrendszerből. Az agyi endotélsejtek ABC (ATP-binding cassette) transzporterei közül a legfontosabbak a P-glikoprotein (Pgp, ABCB1), a multidrog rezisztencia fehérjék (MRP-k, ABCC1, 2, 4, 5 és valószínűleg a 3 és 6) és a mellrák rezisztencia fehérje (BCRP, ABCG2). A paracelluláris, a transzcelluláris, valamint a metabolikus gát, illetve az efflux pumpák által képezett négyeszeres védvonal kialakítása révén a gát funkcióért elsősorban az agyi endotélsejtek felelősek.

Az agyi endotélsejtek vér-agy gátat kialakító képessége azonban nem egy előre meghatározott program eredménye. Stewart és Wiley (1981) transzplantációs kísérleteik során bizonyították, hogy a gát létrejöttét a központi idegrendszeri mikrokörnyezet indukálja. Janzer és Raff (1987) azonosította elsőként e mikrokörnyezet egyik fontos elemeként az asztrocitákat, amely sejtek nem neurális környezetből származó endotélsejtek esetében is képesek vér-agy gát tulajdonságok létrejöttét indukálni. Önmagukban az agyi endotélsejtek tehát nem lennének képesek ellátni funkciójukat, a vér-agy gát kialakulásához (Bautch és James, 2009, Mancuso és mtsai, 2008) és fiziológiás működéséhez más sejttípusokra és környezeti elemekre is szükség van.

A bazális membrán extracelluláris mátrixának egyes összetevői direkt kölcsönhatásban állnak az endotéliummal. A laminin, a IV-es típusú kollagén és más mátrix fehérjék valamint az endotélsejtek integrin receptorai között létrejövő kapcsolatok révén a bazális lamina elemeihez mintegy kihorgonyoznak az endotélsejtek (del Zoppo és Hallenbeck, 2000). A sejt-mátrix kölcsönhatás számos intracelluláris jeltovábbító útvonalat befolyásol (Tilling és mtsai, 2002) és a mátrix fehérjék elősegítik az endoteliális TJ fehérjék kifejeződését is (Savettieri és mtsai, 2000).

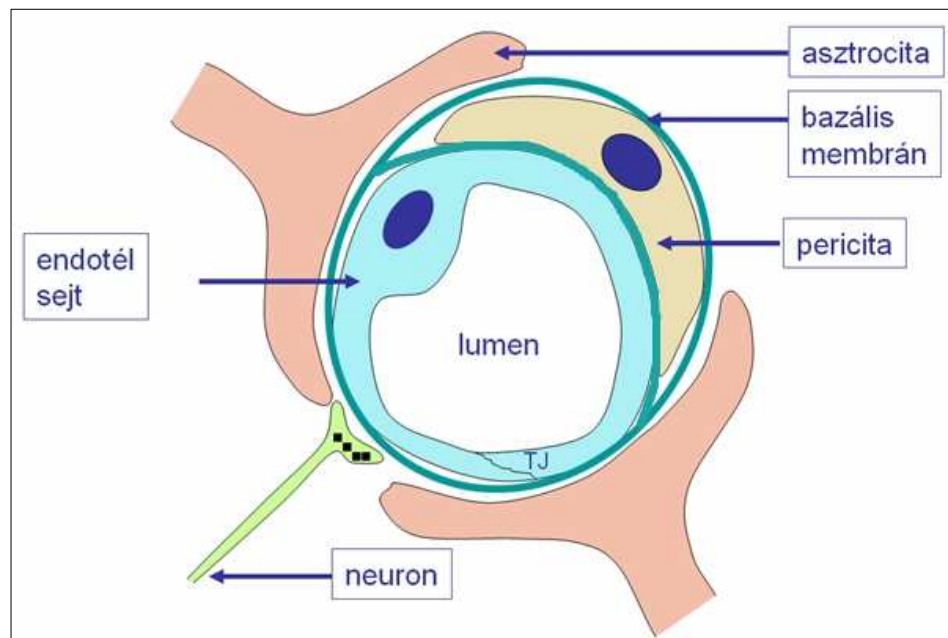
A bazális membrán megkettőződésben található periciták IV-es típusú kollagén, glükózaminoglikánok, valamint laminin termelésével hozzájárulnak az ér bazális membrán kialakításához (Cohen és mtsai, 1980, Mandarino és mtsai, 1993). Ezek a sejtek továbbá számos olyan faktort termelnek, amelyek erősítik az endotélsejtek gát funkcióját. A periciták által termelt angiopoietin-1 például fokozza egy fontos szoros kapcsolat fehérje, az occludin kifejeződését (Hori és mtsai, 2004). Az endotélsejtek és a periciták közötti direkt, réskapcsolatokon keresztüli kommunikáció létét is bizonyították *in vitro* (Lai és Kuo, 2005).

Az asztrociták jelenléte is erősíti az endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságait. Az asztrociták és az endotélsejtek befolyásolják egymás szerkezetét: kölcsönhatásuk indukálja és szabályozza a vér-agy gát kialakulását. Számos glia eredetű faktor, így a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), a glia-eredetű neurotrófikus faktor (GDNF) és az angiopoietin-1 is segíti az endoteliális szoros kapcsolatok kialakulását és az egyedi agyi endotél fenotípus létrejöttét (Abbott és mtsai, 2006). Ezen anyagok hatására szorosabb kapcsolatok (fizikai gát) jönnek létre az endotélsejtek között (Dehouck és mtsai., 1990, Rubin és mtsai, 1991), továbbá elősegítik a specifikus transzporterek, például a Pgp (Schinkel, 1999) és a GLUT1 glükóz transzporter (transzport gát) (McAllister és mtsai, 2001), valamint specializált enzimrendszerek (metabolikus gát) (Sobue és mtsai, 1999, Haseloff és mtsai, 2005) kifejeződését és polarizált elhelyezkedését az endotélsejtekben.

Mindezekon túl az idegsejtek is részt vesznek a vér-agy gát működésének szabályozásában. A neuronokról úgy gondolják, hogy elsősorban az asztrocitákon keresztül kommunikálnak a vér-agy gáttal (Koehler és mtsai, 2006), de közvetlen endotél beidegzést is azonosítottak (Hamel, 2006). Az agyi endotélsejteket és/vagy az asztrocita végtalpakat noradrenerg (Cohen és mtsai, 1997a), szerotonerg (Cohen és mtsai 1997b), kolinerg (Tong és Hamel, 1999) és GABAerg (Vaucher és mtsai, 2000) neuronok idegzik be. Ezen idegi mechanizmusok szerepe a vér-agy gát szabályozásában még nem teljesen

tisztázott folyamat, bár néhány részlete, így az, hogy az idegsejtek elősegítik az agyi endotélsejtek egyedi enzimeinek kifejeződését, régóta ismeretes (Tontsch és Bauer, 1991).

Habár a gát funkció kialakításáért elsősorban az agyi endotélsejtek felelősek, a vér-agy gát normális működéséhez tehát számos más sejtre és környezeti elemre, így az asztrocitákra, a pericitákra, az idegsejtekre, valamint a bazális membrán extracelluláris mátrixának elemeire is szükség van. Az így kialakuló funkcionális egységet összefoglaló néven neurovaszkuláris egységnek nevezzük (1. ábra).



1. ábra A neurovaszkuláris egység sematikus rajza

Vannak azonban a központi idegrendszernek olyan részei is, ahol a kapilláris endotélsejtek nem zárnak ilyen szorosan. Az agykamrák körüli egyes területeken, a cirkumventrikuláris szervekben a kapillárisok permeabilitása megfelel az általános kapillárispermeabilitásnak, ezért a vérplazmában lévő kémiai anyagok közvetlenül hatnak a cirkumventrikuláris szervek idegsejtjeire. Ezek a vér-agy gáton kívül található szervek a központi idegrendszerben a neurohipofízis, az eminentia mediana, az organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), a subfornicalis szerv, az area postrema, a subcommissuralis szerv és a tobozmirigy (corpus pineale). Természetesen, bár az említett területeken az endotélsejtek nem töltik be gát funkciójukat, ezeken a helyeken is létrejön egy határfelület a keringés és a központi idegrendszer között. A fizikai akadályt a vérben keringő anyagok számára ezekben az esetekben a cirkumventrikuláris szervek módosult endotélsejtjei

által képezett, valamint a taniciták és az asztrociták nyúlványai között kialakuló szoros kapcsolatok jelentik, amelyek elszigetelik e szerveket az agyszövettől (Brightman, 1992).

Anyagtranszport a vér-agy gáton keresztül

A vér-agy gát természetesen nem zárhatja el teljes mértékben a központi idegrendszert a keringéstől, hiszen akkor a tápanyagok bejutását is megakadályozná, ami végzetes következményekkel járna az idegsejtekre nézve. Az agyi endotélsejtek membránjaiban számos transzporter található, amelyek az agyszövet táplálásával kapcsolatos anyagszállítást bonyolítják le. Az agyi endotélsejtek tehát a gát (barrier) funkciójuk mellett szállító (carrier) funkcióval is bírnak, ami az agy tápanyagokkal való ellátását szolgálja. Mivel a szomszédos endotélsejtek között kialakuló szoros kapcsolatok fizikai akadályt képeznek a vérben keringő anyagok számára, az agy tápanyagokkal történő ellátása az endotélsejteken keresztül megy végbe (transzcelluláris transzport). Az endotélsejtek plazmamembránja fiziológiai körülmények között csak a kis lipofil és a kis molekulatömegű gáznemű anyagok (így az O_2 és CO_2) számára járható át szabadon. A hidrofil, poláros és 400-500 Daltonnál nagyobb molekulatömegű anyagok csak speciális transzportrendszerek segítségével juthatnak a véráramból az agyba. Az endotélsejtek membránjában számos transzport fehérje (szállítók) található a hexózok (glükóz, galaktóz), bázikus, savas, neutrális aminosavak, monokarboxilsavak (tejsav, piroszőlősav, ketontestek), purinok (adenin, guanin), nukleozidok (adenozin, guanozin, uridin), valamint aminok (kolin), organikus anionok és kationok vérből a központi idegrendszerbe történő szállításához. Számos makromolekula, így peptidek, fehérjék (például transferrin, inzulin, tumor nekrozis faktor (TNF), epidermális növekedési faktor (EGF), lipoproteinek és glikozilált fehérjék) receptor mediált transzport révén jutnak át az agyi endotéliumon (transzcitózis). Egyes pozitív töltéssel rendelkező makromolekulák pedig adszorpció mediált transzport segítségével jutnak a keringésből a központi idegrendszerbe (például a humán immundeficiencia vírus TAT (trans-activator of transcription) fehérjéje. Ezen molekulák endotélsejteken keresztüli érintetlen átjutásához elengedhetetlen a transzport során a lizoszómák elkerülése, ami úgy tűnik a vér-agy gát endotéliumának egyedi tulajdonsága, mivel számos perifériás endotélsejtre nem jellemző az intakt transzcitózis (Nag és Begley, 2005). A különböző anyagok helyes irányba történő szállítását biztosítja a transzportrendszerek endotélsejteken belüli aszimmetrikus elrendeződése is (összefoglaló

közlemények a témában: Bernacki és mtsai, 2008, Abbott és mtsai, 2010, valamint Ohtsuki és Terasaki, 2007).

A vér-agy gát komoly akadályt jelent a központi idegrendszert célzó gyógyszerek terápiás koncentrációban történő agyba juttatása esetében, mivel a potenciális hatóanyagok 95%-a nem jut át az agyi endotéliumon (Persidsky és mtsai, 2006). A hatóanyagok agyba juttatására jelenleg alkalmazott módszerek számos hátránnyal rendelkeznek (összefoglaló közlemények a témában: Fehér és mtsai, 2007, Banks, 2009, valamint Misra és mtsai, 2003). Ezért a központi idegrendszeri gyógyszertranszport problematikája további, a jelenlegiekénél jóval hatékonyabb és kevesebb káros mellékhatással rendelkező megoldásokat igényel. Éppen ezért a neurobiológia egyik alapvető feladata a vér-agy gát működésének mind jobb megértése, a molekuláris mechanizmusok tisztázása.

Az agyi endotélsejtek közti kapcsolatok

Elektronmikroszkópos felvételeken jól láthatóak a szomszédos agyi endotélsejtek között kialakuló fúziós pontok, ahol a sejtek külső membránjai fizikailag összekapcsolódnak, átjárhatatlan gátat képezve ezáltal. Ezek a kapcsolódási pontok a már említett szoros kapcsolatok, amely sejtkapcsoló szerkezetek megtalálhatóak az epitél-, endotél- és mezotélsejteknél is. A szoros kapcsolatok a tőlük bazálisan elhelyezkedő adherens kapcsolatokkal (adherens junction, AJ) együtt képezik a sejtek közötti kapcsoló szerkezeteket. Számos fehérje vesz részt e bonyolult kapcsolatok kialakításában. A transzmembrán fehérjék egymással összekapcsolódva kötik össze a szomszédos sejteket, míg a citoplazmában elhelyezkedő plakkfehérjék a membránfehérjéket az aktin sejtvázhoz horgonyozzák. A sejtkapcsoló szerkezetek felépítését és működését számos jeltovábbító molekula szabályozza, amelyek közvetlenül is kapcsolódni képesek a sejtkapcsoló fehérjékhez.

A szoros kapcsolatok

A többsejtű élőlények esetében a szoros kapcsolatok szerepe alapvető az egymástól elválasztott kompartmentek kialakításában, valamint a belső és a külső környezet közötti anyagcserében. A szoros kapcsolatok övszerűen veszik körbe az epitél- és endotélsejteket, ezáltal paracellulárisan fizikai akadályt képeznek. Emellett ezek a szerkezetek megakadályozzák az integráns membránfehérjék laterális diffúzióját is, elválasztva

egymástól ezáltal az apikális és a bazolaterális membránfelszíneket (kerítés (fence) funkció), vagyis kialakítják a sejtek polaritását.

A szoros kapcsolatok területén 3 integráns fehérje található: az occludin, a claudinok és a JAM (junctional adhesion molecule), amelyek közül az első kettő alkotja a szoros kapcsolatok gerincét. Az occludin volt a szoros kapcsolatok elsőként felfedezett transzmembrán fehérjéje (Furuse és mtsai, 1993). Számos kísérlet igazolta az occludin szerepét a szoros kapcsolatok kialakításában (Balda és mtsai, 1996, valamint Chen és mtsai, 1997, Wong és Gumbiner, 1997). Ugyanakkor occludin hiányos embrionális őssejtek is képesek ép szoros kapcsolatokat kialakító epitelsejtekké differenciálódni (Saitou és mtsai, 1998).

A rejtélyt, hogy miképpen képesek szoros kapcsolatok occludin nélkül is kialakulni, Furuse és munkatársai oldották meg a claudin-1 és -2 fehérje felfedezésével (1998). A claudin fehérje családnak több mint 20 tagját azonosították eddig (Morita és mtsai, 1999, Mitic és mtsai, 2000), amelyek közül elsősorban a claudin-5 jellemző az agyi endotelsejtekre, de a claudin-3, -10 és -12 is kifejeződik e sejtekben (Ohtsuki és mtsai, 2008). A claudinok szövetspecifikus kombinációban fejeződnek ki, ami szövetspecifikus gát tulajdonságokat eredményez (Krause és mtsai, 2008). Akárcsak az occludin, a claudinok is négy transzmembrán doménnel és két extracelluláris hurokkal rendelkeznek, azonban szekvenciahomológia nincs közöttük.

A harmadik integráns membránfehérje, amely az előzőekkel ellentétben egyetlen transzmembrán doménnel rendelkezik, a junctionális adhézis molekula (junctional adhesion molecule, JAM) (Martin-Padura és mtsai, 1998). Napjainkra már hat JAM fehérje vált ismertté, amelyek közül a JAM-A és a JAM-C járul hozzá a szoros kapcsolatok gát funkciójának kialakításához epitél- és endotelsejtekből (Liu és mtsai, 2000, valamint Aurrand-Lions és mtsai, 2001).

A transzmembrán fehérjék a citoplazmában számos más alkotóelemmel hatnak kölcsön, amelyek nagy fehérjekomplexet, a citoplazmikus plakkot alkotják. Ezek a molekulák horgonyozzák a már említett transzmembrán fehérjéket az aktin sejtvázhhoz. A plakkfehérjék közül az adapterek több fehérje-fehérje kölcsönhatást kialakító doménnel rendelkeznek. Ilyen domének az SH-3 (src homology 3), a GK (guanylate kinase) és a PDZ (PSD95-DlgA-ZO-1) domének is (Harris és Lim, 2001, Pawson és Nash, 2003). Ezek a domének segítik a membránfehérjéket a sejtvázhhoz horgonyozni, valamint a jeltovábbító komplexeket összetartani (Ranganathan és Ross, 1997). Az adapter fehérjék közé tartoznak a MAGUK (membrane associated guanylate kinase) fehérjecsalád tagjai, amelyek közül a

zonula occludens-1 (ZO-1) volt az első azonosított TJ fehérje (Stevenson és mtsai, 1986). A ZO-2 és a ZO-3 fehérjéket később fedezték fel (Gumbiner és mtsai, 1991, Haskins és mtsai, 1998). A ZO molekulák a szoros, valamint az adherens kapcsolatok alkotóelemei és az aktin között teremtik meg az összeköttetést, a ZO-3 azonban kizárólag az epitelsejtekre jellemző (Inoko és mtsai, 2003).

Az említett molekulákon túl a szoros kapcsolatokhoz számos egyéb, PDZ-doménnel rendelkező citoplazmatikus adapter fehérje is kapcsolódik: az AF6/afadin (Ikeda et al, 1999, Zhadanov et al 1999), a MUPP1 (multi-PDZ domain protein 1) (Latorre és mtsai, 2005, Sugihara-Mizuno és mtsai, 2007) és a MAGI (MAGUKs with inverted domain structure) fehérjecsalád két tagja, a MAGI-1 és a MAGI-3 (Ide és mtsai, 1999 és Laura és mtsai, 2002). Ezek a fehérjék a többi sejtkapcsoló molekulával is kölcsönhatnak, valamint a jeltovábbításban résztvevő fehérjékhez is kapcsolódnak, miáltal a sejtkapcsoló szerkezetek összerendezésében is fontos szerepet töltenek be.

A citoplazmatikus plakk kialakításában számos PDZ-domént nem tartalmazó fehérje is szerepet játszik, ilyenek a cingulin (Citi és mtsai, 1988), a JACOP/paracingulin (Ohnishi és mtsai, 2004), az angiomotin (Bratt és mtsai, 2005), a JEAP (junction enriched and associated protein) (Nishimura és mtsai, 2002) és a MASCOT (MAGI-1-associated coiled-coil tight junction protein) (Patrie, 2005), bár ez utóbbi két molekula nem található meg az endotelsejtekben.

Az adherens kapcsolatok

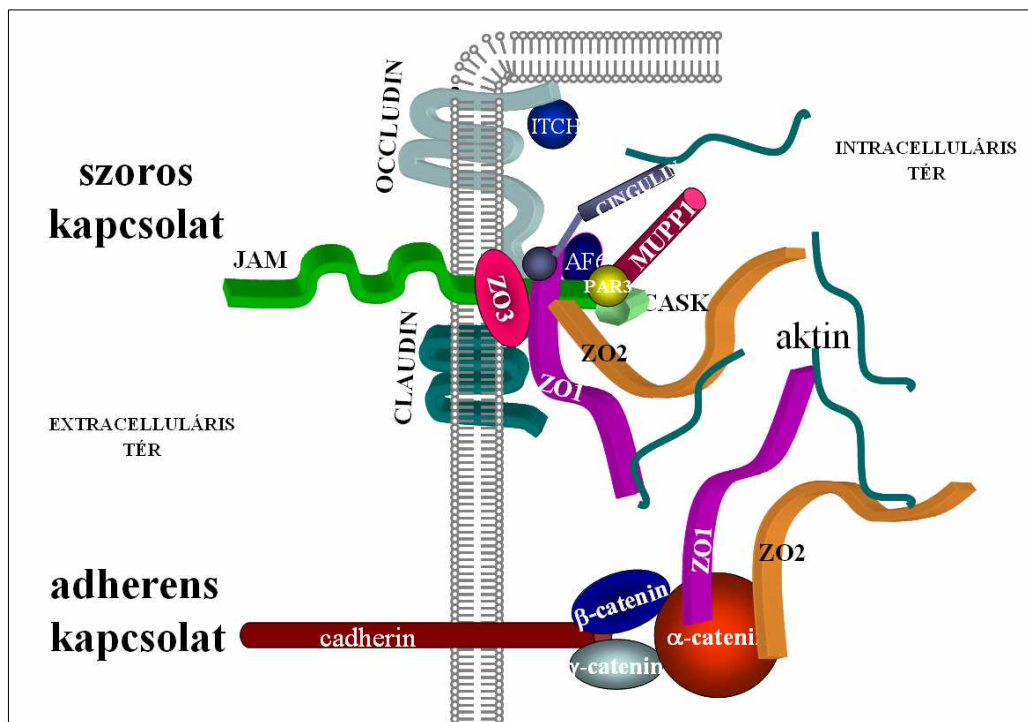
Az adherens kapcsolatok mindenütt jelen vannak a vér- és a nyirokerekben, szerepet játszanak az endotelsejtek adhéziójában, a kontakt gátlás létrejöttében az erek növekedésekor és újrarendeződésekor, a sejtpolaritás kialakításának elindításában és – a szoros kapcsolatok mellett – a paracelluláris permeabilitás szabályozásában is. Az adherens kapcsolatok a szoros kapcsolatokhoz közel, azoktól bazálisan helyezkednek el, és szintén övszerűen veszik körbe a sejteket.

Az adherens kapcsolatok transzmembrán elemei a cadherin szupercsalád glikoproteinjei, amely molekulák Ca^{2+} -függő módon, homodimerek kialakítása révén segítik a szomszédos sejtek egymáshoz tapadását (Steinberg és McNutt, 1999). A cadherineknél közül az agyi endotelsejtek adherens kapcsolataiban a vaszkuláris endoteliális (VE)-cadherin található meg a legnagyobb mennyiségben (Dejana, 1996). A cadherin citoplazmatikus, karboxi-terminális doménjéhez a β - és γ -catenin (plakoglobin) (Kemler,

1993), valamint a velük homológ p120 catenin kapcsolódik (Anastasiadis és Reynolds, 2000). Mind a β -catenin, mind a plakoglobin képes kötődni az α -cateninhez (Ben-Ze'ev és Geiger, 1998), amely fehérje homológ a vinculinhoz és a cadherin-catenin komplexek valamint az aktin között teremti meg az összeköttetést (Kobielak és Fuchs, 2004). Az α -catenin képes továbbá az α -actininhez (Knudsen és mtsai, 1995) és a vinculinhoz (Watabe-Uchida és mtsai, 1998) is kötni, ezáltal erősítve az adherens kapcsolatok és a sejt-váz között képezett hidat. E fehérje továbbá a szoros kapcsolatok citoplazmatikus elemeihez, a ZO-1 és ZO-2 fehérjékhez is képes kapcsolódni (Itoh és mtsai, 1997 és 1999).

Az α -catenin adherens kapcsolatokban betöltött szerepét ugyanakkor megkérdőjelezzik azok a kutatási eredmények, miszerint a fehérje nem képes egyidőben kötni az aktinhoz és a β -cateninhez (Yamada és mtsai, 2005). A vizsgálatok alapján úgy tűnik, az α -catenin fő szerepe a vándorló sejtekben a cadherine által közvetített sejt-sejt kapcsolatok létrejötte után a lamellipódiumok kialakulásának megakadályozásában van (Drees és mtsai, 2005).

Az adherens kapcsolatok funkciója tehát elsődlegesen a szomszédos sejtek közötti kezdeti kapcsolatok kialakításában van, ezen túlmenően viszont szükségesek a szoros kapcsolatok létrejöttéhez (Schulze és Firth, 1993) és fenntartásához is (Pal és mtsai, 1997), ezáltal a paracelluláris permeabilitás szabályozásában is fontos szerepet játszanak. A szoros és adherens kapcsolatok által kialakított endoteliális sejtkapcsoló komplexeket a 2. ábra mutatja be.



2. ábra A szoros és adherens kapcsolatok sematikus rajza

Az endoteliális kapcsolatok szabályozása

Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak, hogy a vér-agy gátat nem valamiféle merev, statikus falként kell elképzelnünk, hanem egy nagyon is dinamikus szerkezetként, amely gyors és pontos változásokra képes. E folyamat alapját a szomszédos endotélsejtek sejtkapcsoló szerkezeteinek bonyolult szabályozási mechanizmusai képezik (Matter és Balda, 2003, González-Mariscal és mtsai, 2008). A szoros és adherens kapcsolatok szabályozására vonatkozó ismereteink főként epitél és nem agyi eredetű endotélsejteken végzett *in vitro* kísérletekből származnak, az agyi endotélsejtekben lejátszódó folyamatok még nem teljesen tisztázottak. Ez azért is alakulhatott így, mivel a vér-agy gát sokkal bonyolultabb rendszer, lévén asztrocitákat, pericitákat, valamint extracelluláris mátrix komponenseket is magába foglal, ezáltal lényegesen nehezebb modellezni.

A szoros és adherens kapcsolatokat alkotó fehérjék komplex szabályozási mechanizmusok célpontjai, amely folyamatok a fehérjéket kódoló gének transzkripcióját, a fehérjék poszttranszlációs módosításait (főként foszforilációját) és lebomlását is magukba foglalják. A sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésének és foszforilációjának pontos szabályozását a permeabilitás változásai is jelzik (Hirase és mtsai, 2001, Kevil és mtsai, 2001). A szoros kapcsolatokat befolyásoló legfontosabb molekulák közé tartoznak a

ciklikus nukleotidok (cAMP, cGMP), a nitrogén-monoxid (NO), a Ca^{2+} , a heterotrimer és kis G-fehérjék (Rho, Rac, Rab, Ras), illetve a szerin/treonin és tirozin foszforiláción alapuló jeltovábbító kaszkádok tagjai (MAP kinázok, Rho kináz, PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase)/Akt, receptor tirozin kinázok (RTK) és citoplazmatikus protein tirozin kinázok (cPTK) is (összefoglaló közlemény: Krizbai és Deli, 2003).

Az utóbbi években megjelentek a szakirodalomban olyan adatok is, amelyek szerint egy, az agyi endotélsejtekben a mai napig alig vizsgált jeltovábbító útvonal, a Toll-szerű receptorokból kiinduló jeltovábbítás effektor elemei is képesek befolyásolni az endoteliális kapcsolatokat (Singh és mtsai, 2007).

A Toll-szerű receptorok

A Toll-szerű receptorok családjának első elemét 1985-ben azonosították és először az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) embrió fejlődésében, a dorzoventrális polaritás kialakításában betöltött szerepét írták le (Anderson és mtsai, 1985). 1996-ban Lemaitre és munkatársai felfedezték, hogy a receptor a gombafertőzés elleni védelemben is fontos szerepet tölt be. Egy évvel ezután Medzhitov és kollégái azonosították a receptor emberben található formáját (amely később a TLR4 nevet kapta), valamint kimutatták, hogy a receptor jelátviteli útvonalának aktivációja gyulladásos citokinek termeléséhez vezet humán sejtekben, továbbá egy, a T sejtek aktivációjához szükséges kostimuláló molekula kifejeződését is serkenti. Poltorak és munkatársai 1998-ban közöltek egy másik igen fontos kísérleti eredményt: kimutatták, hogy a Gram-negatív baktériumok membránjában található lipopoliszacharid (LPS) által kiváltott jeltovábbításhoz szükség van a TLR4-re.

A Toll-szerű receptorokat egy nagyobb receptor családba, a mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptor, PRR) közé soroljuk (Akira és mtsai, 2006). E receptorok közös jellemzője, hogy olyan elemeket ismernek fel, amelyek azonosak a különböző patogéneknél, mivel nélkülözhetetlenek a kórokozók túléléséhez. Ezek az elemek nem egy adott szerkezetet, hanem bizonyos molekuláris mintázatokat jelentenek (kórokozóhoz kapcsolódó molekuláris mintázat, pathogen-associated molecular pattern, PAMP). Ilyen, a gazdaszervezet saját struktúráitól alapvetően különböző mintázatot jelentenek például a Gram-negatív baktériumok falában jelen levő lipopoliszacharidok (LPS), a bakteriális lipoproteinek (BLP), a peptidoglikánok (PGN), a lipoteikolsav (LTA), a nem metilált bakteriális CpG-DNS vagy az élesztő esetében a mannán és a zymosan.

A receptorok megtalálhatóak a sejtek felszínén és azok belsejében is. A sejtasszociált receptorok ligandjuk kötése után különböző jeltovábbító útvonalakon keresztül eredményezik a kórokozók eltávolítását elősegítő effektor molekulák termelődését. Attól függően, hogy mely receptorok és mely intracelluláris jeltovábbító útvonalak aktiválódnak, többé-kevésbé patogénspecifikus immunválasz generálódhat. A Toll-szerű receptorok kulcsszerepet játszanak a kórokozók felismerésében és a természetes immunválasz beindításában (Janeway és Medzhitov, 2002, Underhill és Ozinsky, 2002, Takeda és mtsai, 2003).

Az utóbbi tíz évben igen intenzív figyelmet fordítottak az immunológusok a Toll-szerű receptorokra. Mára már ismertté vált, hogy egy igen régóta meglevő receptor családról van szó, amelynek őse több, mint 600 millió évvel ezelőtt alakulhatott ki. Ez a fehérjecsald nagyfokú konzerváltságot mutat az állatvilágban, tagjai a fonálféregtől az emberig minden eddig vizsgált fajban megtalálhatóak. Emlősökben a mai napig 13 Toll-szerű receptort azonosítottak, az emberben pedig tízet (Guan és mtsai, 2010) Az egyes receptorokat külön számmal jelölik. A TLR molekulákkal homológ fehérjét azonosítottak már növényekben is (Whitham és mtsai, 1994). A növényi R- (resistance) fehérjék, amelyek szintén tartalmazznak TIR doméneket, fontos szerepet töltenek be az antimikrobiális védekezésben (Belkadir és mtsai, 2004).

A TLR-ek I-es típusú transzmembrán fehérjék, egyetlen transzmembrán doménnel rendelkeznek. Az interleukin-1 (IL-1) receptor családba tartoznak, e besorolás alapját az intracelluláris rész nagyfokú hasonlósága adja, ahol a közös Toll/IL-1 (TIR) domén található. A TLR-ek ligandspecifitása, sejten belüli elhelyezkedése és jeltovábbító útvonalai is különböznek, s mivel a receptorok sejt-, illetve szövetspecifikus variációban fejeződnek ki (Hallman és mtsai, 2001), így sokféle, viszonylag specifikus immunválasz keletkezhet. Ráadásul a TLR-ek kifejeződése és transzkripciós szabályozása a különböző sejtekben fajokénti eltéréseket is mutat (Rehli, 2002).

A sejten belüli elhelyezkedésük alapján a humán TLR-eket két csoportra lehet osztani: többségük a plazmamembránban található (TLR1, 2, 4, 5 és 6), míg néhányan intracellulárisan, az endoplazmatikus retikulumban, illetve endoszómák és lizoszómák membránjában helyezkednek el (TLR3, 7, 8, 9) (Takeda és Akira, 2005). Egyes megfigyelések szerint a sejten belüli elhelyezkedésnek fontos szerepe lehet a saját illetve a nem saját nukleinsavak megkülönböztetésében (Barton és mtsai, 2006).

A receptorok ligandspecifitása igen széles spektrumú és nagyon különböző (Akira és Hemmi, 2003). A TLR2 a Gram-pozitív baktériumok különböző komponenseit köti, a peptidoglikánokat, lipoteikolsavat, a Mycobaktériumból származó lipoarabinomannánt, valamint a gomba sejtfal egyik fontos alkotóelemét, a zymosant is. A TLR2 a TLR1 és TLR6 molekulákkal heterodimert képez, velük együtt triacil- és diacil-lipopeptideket is felismer (Ozinsky és mtsai, 2000, valamint Farhat és mtsai, 2008). A TLR2/6 heterodimert számos anyag aktiválhatja: Gram-pozitív baktériumok alkotóelemei éppúgy, mint az élesztő sejtfal komponensek, így a zymosan is (Ozinsky és mtsai, 2000). A vaccinia vírus is e receptorokon keresztül fejti ki hatását (Delaloye és mtsai, 2009). A légúti óriássejtes vírus (respiratory syncytial virus) szintén a TLR2/6-on keresztül aktiválja a természetes immunrendszert (Murawski és mtsai, 2009), serkentve ezáltal a TNF- α , az IL-6, a CCL2 (monocita kemoattraktáns fehérje) és a CCL5 (RANTES) termelődését is. A TLR4 a Gram-negatív baktériumok falában található lipopoliszacharidot (LPS), a TLR5 pedig a Gram-negatív baktériumok mozgásáért felelős flagellum fő alkotóelemét, a flagellint köti. A sejten belül elhelyezkedő TLR-ek a mikrobiális nukleinsavak felismerésében játszanak szerepet. A TLR3 a virális kettős szálú RNS-t, míg a TLR7 és TLR8 az egyszálú RNS-t köti. A TLR9 a bakteriális és virális metilátlan CpG DNS felismeréséért felelős. A legújabb eredmények szerint a TLR10 a TLR2-vel kooperálva bakteriális és gomba komponenseket ismer fel (Guan és mtsai, 2010).

A gerincesek Toll-szerű receptorainak esetében a jeltovábbítás a ligandkötést követő dimerizációval kezdődik. A különböző TLR-ek homo-, illetve heterodimereket képeznek más TLR-ekkel vagy egyéb koreceptorokkal (például TLR3-TLR3, TLR2-TLR1, TLR2-TLR6 vagy TLR4-MD2) (Jin és Lee, 2008). Az ektodomének összekapcsolódása a fehérjék citoplazmatikus részén olyan változást indukál, amely lehetővé teszi az adapter fehérjék kötődését. Ez a folyamat a receptorok TIR doménjeinek újfajta elrendeződését eredményezi, ezáltal biztosítva a specifitást a hasonló doménnel rendelkező adapterek kötéséhez. Öt emlős adapter fehérjéről ismert jelenleg, hogy saját TIR doménjükön keresztül közvetlenül kapcsolódnak az aktivált TLR-ekhez: ezek a MyD88 (myeloid differentiation 88), a MAL (Myd88-adaptor-like), a TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β), a TRAM (TRIF-related adaptor molecule) és a SARM (sterile α - and armadillo-motif containing protein) fehérjék. A receptoroktól kiinduló jeltovábbító

útvonalak specificitásának alapját az azokhoz kötődő adapter fehérjék kombinációja képezi.

Az adapter fehérjék által elindított jeltovábbító kaszkádok elemei közül központi szerepe van az NF- κ B (nuclear factor- κ B) transzkripció faktorának, mivel ezt a molekulát a TLR3-on kívül mindegyik receptor képes aktiválni. Az intracellulárisan elhelyezkedő Toll-szerű receptorok az NF- κ B mellett az IRF3 és IRF7 (interferon regulatory factor) transzkripció faktorokat is aktiválhatják. A plazmamembránban elhelyezkedő TLR-ek pedig a JNK (c-Jun N-terminal kinase), a p38 és az ERK (extracellular regulated kinase) MAP (mitogen activated protein) kinázokon keresztül az AP-1 (activating protein-1) transzkripció faktort aktiválják. Ezen transzkripció faktorok a Toll-szerű receptorokból kiinduló jeltovábbító útvonalak effektor elemei, általuk történik a gyulladásos citokinek, az I-es típusú interferonok és kemokinek kifejeződésének indukálása, azaz a természetes immunválasz beindítása (összefoglaló közlemények a témában: Kawai és Akira, 2006, Banerjee és Gerondakis, 2007, valamint Kumar és mtsai, 2009)

Endogén TLR ligandok

Az immunrendszer alapvető funkciója, hogy különbséget tegyen saját és nem saját anyagok között: a sajátot tolerálja, míg a nem sajátja immunválasszal reagál (Medzhitov és Janeway, 1997 és Hoffmann és mtsai, 1999). A Toll-szerű receptorok a természetes immunrendszer részeként e folyamatban játszanak kiemelkedő szerepet. Meglepő módon azonban az elmúlt évek vizsgálatai során több olyan endogén anyagot – azaz a gazdaszervezet saját anyagát - is találtak, amelyek képesek kötni a TLR-ekhez. Ilyen jel lehet egy sérült sejtből felszabaduló intracelluláris alkotórész, amely így a fertőzés hiányában is immunválaszt generálhat. Stresszhatásra például a hősokkfehérjék (HSP) fokozott mértékben fejeződnek ki, így vészjelző molekulaként működhetnek. A hősokkfehérjék közül a HSP60-ról, a HSP70-ről és a HSP90-ről is kimutatták, hogy képesek aktiválni a TLR2 és TLR4 receptorokat (Vabulas és mtsai, 2001 és 2002, valamint Chung és mtsai, 2009). További kutatások egyéb endogén faktorokról is kimutatták, hogy a TLR4-hez kötődve képesek azt aktiválni, úgymint az extracelluláris mátrix lebontásakor képződő hialuronsav és fibronectin töredékek (Okamura és mtsai, 2001, Scheibner és mtsai, 2006).

A már említett anyagokon túl a szabadgyökök is hatással vannak e receptorokra. Bizonyos baktériumok ugyanis oxigén eredetű szabadgyököket is képesek felszabadítani,

amivel károsítják a megtámadott szervezet sejtjeit (Hoffmann és mtsai, 2006). Ugyanakkor a gazdaszervezet saját sejtjei, így a fertőzések során az aktiválódó immunsejtek is gyakran termelnek reaktív oxigén gyököket (Forman és Torres, 2002), amelyek segítik a kórokozók elpusztítását. Az immunsejtek által termelt szabadgyökök azonban gyulladást és apoptózist is generálhatnak a szervezet saját sejtjeiben (Martindale és Holbrook, 2002), így az érfal endotélsejtjeiben is. Az oxigén gyökök által indukált jeltovábbító útvonalak még kevésbé ismertek, azonban egyre több az adat arra vonatkozóan, hogy a Toll-szerű receptoroknak nemcsak a fertőzések által kiváltott, de az endogén gyulladási folyamatok eredményeképpen létrejövő oxidatív stressz hatásainak közvetítésében is fontos szerepe lehet (Zhang és mtsai, 2005, Bsibsi és mtsai, 2006, valamint Gill és mtsai, 2010).

Az oxidatív stressz a reaktív oxigén vagy nitrogén eredetű szabadgyökök keletkezése és az antioxidáns védekező rendszerek közötti egyensúly megbomlása során lép fel. A már említett szabadgyökök ugyanis olyan molekulák, amelyek egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak, emiatt rendkívül hajlamosak a párképződésre. A szabadgyökök instabilak és igen reaktívak, az általuk elindított reakciók nem enzimatisz láncreakciók. A szabadgyökök féléletideje igen rövid, szinte azonnal reakcióba lépnek a szervezetben található makromolekulákkal (DNS, fehérjék, szénhidrátok, lipidek), az oxidáció révén előidézve azok szerkezeti és funkcióbeli károsodását (Wolin, 2000). Szabadgyökök a szervezetben élettani körülmények között is keletkeznek kis mennyiségben, azonban ezeket antioxidáns enzimek és antioxidáns anyagok folyamatosan inaktíválják (Gutteridge, 1995). Az oxidatív stressz kialakulásához a szabadgyökök kontrollálatlan keletkezése vagy az antioxidáns rendszer működésének csökkenése vezet. Szinte nincs olyan betegség, ahol a szabadgyökök károsító hatását ne mutatták volna ki, vagy a szabadgyökök túlermelődése vagy az antioxidáns rendszer károsodása miatt.

Fokozottan képződnek szabadgyökök különböző gyógyszerek, antibiotikumok (Amacher, 2006) hatására is. A szervezetet érő elektromágneses sugárzás (Soloviev és mtsai, 2003), az ultraibolya sugárzás, továbbá gázok (például ózon) és anorganikus részecskék (azbeszt, szilícium-dioxid, stb.) belélegzése, valamint toxinok, xenobiotikumok (peszticidek, herbicidek, fémek, kémiai szennyező anyagok) szervezetbe jutása is jelentős szabadgyök képződést indíthat el (Stohs, 1995, valamint Amacher, 2006). Az exogén szabadgyökforrások között manapság igen előkelő helyet foglal el a dohányfüst, ugyanis egyre több ember hódol a dohányzás szenvedélyének, amely nemcsak a gyakorlójára, de annak környezetében élőkre is súlyos egészségkárosító hatással van.

A dohányzás élettani hatásai

A dohánytermékek (amelyek leggyakoribb formája a cigaretta) napjaink legveszélyesebb, legtöbb halálos áldozatot követelő legális élvezeti szereit. Az Egészségügyi Világszervezet legutóbbi adatai szerint mára a dohányzás lett az egyik legfőbb, megelőzhető halálozási ok a világon: a dohányzással összefüggésbe hozható megbetegedések évente körülbelül 5,4 millió ember halálát okozzák világszerte. A jelenlegi tendenciát tekintve ez a szám 20 év múlva megkétszereződik. Manapság ugyanis a dohányosok száma egyre emelkedik: jelenleg világszerte körülbelül 1,3 milliárd ember dohányzik, ez a szám 2025-re 1,7 milliárdra emelkedik majd és minden második dohányos halálát egy, a dohányzás okozta betegség fogja eredményezni (WHO jelentés, 2008). A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint a dohányzás miatt Magyarországon évente 28-30000 ember hal meg (Józan és Radnóti, 2002).

Ez az igen magas halálozási arány annak a számtalan betegségnek tudható be, amelyek kialakulásának kockázatát a dohányzás bizonyítottan nagymértékben növeli. A dohányzás felelős ugyanis az idült gyulladásos légúti betegségek 80-85 százalékáért, továbbá a szív- és érrendszeri betegségek 25-30 százalékáért is: számos megbetegedés kockázatát növeli, így a miokardiális infarktust (Frank és mtsai, 1966), a szívkoszorúér-betegséget (Aronow, 1973), és a magas vérnyomást (Halimi és mtsai, 2002) is. A dohányzás súlyos következményei továbbá a rákbetegségek is, amelyeknek legalább 12 típusa hozható kapcsolatba a tevékenységgel (Doll, 1998): ezek a szájüreg, a gége, a garat, a nyelöcső, a tüdő, a húgyhólyag, a gyomor a vese, a hasnyálmirigy, a máj és a méhnyak rákos elváltozásai, valamint a leukémia. Maga a dohányzás a tüdőrák okozta halálozás 90-95 százalékáért, az összes rákhalálozásnak pedig mintegy 30-35 százalékáért felelős. Számos központi idegrendszeri megbetegedés kialakulásának esélyét is jelentősen növeli ez a káros szenvedély: az agyi érkatasztrófa (stroke) egyik típusának, az agyi vérrellátási zavar miatt kialakuló vérrellátási hiányosságnak, más néven agylágyulásnak (ischaemiás stroke) egyik kiváltó okaként is a dohányzást tartják számon (Gállego és mtsai, 2007), és az agyvérzéses esetek (szélütés, gutaütés, haemorrhágiás stroke) negyede is összefüggésbe hozható a dohányzással (Hankey, 1999, valamint Kurth és mtsai, 2003). A dohányzás továbbá egyes neurodegeneratív betegségekkel is kapcsolatba hozható: a Parkinson-kór és az Alzheimer-kór esélye is kétszer nagyobb a dohányosok esetében mint a nemdohányzóknál (Fratiglioni és Wang, 2000). A passzív dohányzás sem veszélytelenebb a szervezetünkre, mintha mi magunk dohányoznánk, hiszen a passzív dohányzás is

jelentősen növeli például a szív- és érrendszeri megbetegedések kockázatát (O'Toole és mtsai, 2008, Raupach és mtsai, 2006, valamint Barnoya és Glantz, 2005). A környezeti dohányfüst ráadásul sokkal mérgezőbb és rákkeltőbb, mint az elsődlegesen belélegzett úgynevezett főfüst (Schick és Glantz, 2005).

A dohányfüst összetevői és az endotélsejtekre kifejtett károsító hatásai

A dohányfüst elnevezés alatt általában a főfüstöt vagy elsődleges füstöt értjük, amit a dohányos közvetlenül belélegez. A mellékfüst (másodlagos füst) a dohánytermék égése során termelődő füst, amelynek az összetétele nem azonos a főfüstével. A dohányfüstben több mint 4000 különböző vegyület keletkezik különböző fizikokémiai és termodinamikai folyamatok során (Hoffmann és Hoffmann, 1997). E kémiai anyagok fele megtalálható a növényben, másik fele viszont az égés során keletkezik. A füst vizsgálata során megkülönböztetünk részecske- és gázfázist. A gázfázis főbb összetevői a szénmonoxid, széndioxid, ammónia, nitrogén oxidok, hidrogén cianid, hidrogén szulfid, metán, kénhidrogén, illetve gáznemű alkánok, aromás szénhidrogének, alkoholok, ketonok, nitrilek, furánok, piridinek és alifás aminok. A részecskefázis legfontosabb alkotórészét képezi a mintegy 300-400 szénhidrogén (ezek közül körülbelül 100 aromás szénhidrogén), továbbá karbonil-származékok, savak, észterek, fenolok és fenoléterek, további alkaloidok és nitrogéntartalmú vegyületek, peroxidok, szterinek és terpének.

Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány vizsgálta a dohányzásnak az egészségre gyakorolt hatását, és mára már a dohányfüst jónéhány vegyületéről bizonyították, hogy rendszeres dohányzás esetén komoly egészségügyi kockázattal bírnak. Jelen értekezés témájából kifolyólag a továbbiakban a dohányfüst azon összetevőire szorítkozom, amelyeknek hatásuk lehet az endotélsejtekre, különös tekintettel az agyi endotéliumra.

A dohányfüst egyik leggyakrabban vizsgált alkotórésze a nikotin (3-(1-metil-2-pirrolidinil)piridin). E vegyületről jónéhány tanulmány bizonyította már, hogy a fő függőséget okozó összetevője a dohányfüstnek, ami a káros következmények ellenére is folyamatosan dohányzásra ösztönöz. A nikotinnak ugyanis hatása van a pszichés állapotra, megvonása esetén hiánytünetek keletkeznek (Stolerman és Shoaib, 1991, Laviolette és van der Kooy, 2004, valamint Hatsukami és mtsai, 2008). Belégzéskor a szervezet a nikotin mintegy 90 százalékát elnyeli, a dohányzás során a főfüst nikotinsói a száj, a garat és az alsó légutak falának nyálkahártyáján, valamint a lenyelt nyálból a gyomornyálkahártyán

keresztül kerülnek a vérbe, a véráram útján pedig körülbelül 7 másodperc alatt az agyba jutnak (Rose és mtsai, 2010).

Az endotélsejtek működési zavarát a dohányfüst ezen egyetlen összetevője is képes kiváltani (Sabha és mtsai, 2000). A nikotin vizsgált hatásainak többségét a nikotinos acetilkolin receptorok (nAChR) aktivációján keresztül váltja ki, amely receptorok az érfal endotélsejtjein is megtalálhatóak (Macklin és mtsai, 1998). Ezek a receptorok szerepet játszanak a sejtek alakjának fenntartásában és szabályozásában, így a nikotin képes lehet mikroér sérüléseket okozni e receptorokon keresztül hatva (Conti-Fine és mtsai, 2000). Tudvalevő ugyanis, hogy a nikotin hatására átrendeződik a marha aorta endotélsejtek sejtváza (Cucina és mtsai, 2000), valamint a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) kifejeződése is növekszik sertés aorta endotélsejtekben (Conklin és mtsai, 2002). A vegyület a nACh receptorokon keresztül hatva stimulálja továbbá a DNS szintézist, ami az érfali endotélsejtek proliferációjához vezet *in vitro* (Villablanca, 1998), továbbá a leukociták adhézióját is elősegíti (Yong és mtsai, 1997).

Ami az agyi endotélsejteket illeti, számos nACh receptor alegység kifejeződését azonosították már e sejteken (Abbruscato és mtsai, 2002, valamint Hawkins és mtsai, 2005) is. A nikotinnak kifejezett hatása van az agyi mikrokeringésre és az agyi artériás tónusra, ami az agyi endotélsejtek működési zavarára utal (Neunteufl és mtsai, 2002, Koide és mtsai, 2005, valamint Jiang és mtsai, 2006). Ismeretes továbbá, hogy a nikotin az agyi endotélsejtekben protein kináz C (PKC) függő módon növeli a plazminogén aktivátor gátló 1 (PAI-1) termelését (Zidovetzki és mtsai, 1999) és képes a patkány vér-agy gát esetében a Na^+ , K^+ -ATPáz kifejeződését csökkenteni (Wang és mtsai, 1994). (Ezen enzimnek fontos szerepe van a központi idegrendszeri ion homeosztázis szabályozásában.) Kimutatták továbbá, hogy a nikotin növeli a permeabilitást és csökkenti a ZO-1 kifejeződését is (Chen és mtsai, 1995, Abbruscato és mtsai, 2002, valamint Hawkins és mtsai, 2004). Ez utóbbi mindezidáig az egyetlen tanulmány, amely a nikotin agyi endoteliális sejtkapcsoló komplexek fehérjéire kifejtett hatására vonatkozik.

A dohányfüst főbb egészségkárosító vegyületei közé tartoznak továbbá a kátrány anyagai is, amelyek a füst mutagén és karcinogén vegyületeinek többségét, így a policiklusos aromás szénhidrogéneket is magukba foglalják. A tüdőbe szívott dohányfüstből a kátrány mintegy 70 százaléka a kicsapódott folyadékszemcsék által lerakódik. Egy átlagos dohányos tüdejébe tíz év alatt egy kilogramm kátrány jut be.

A nikotin mellett a policiklusos aromás szénhidrogének is jelentősen hozzájárulhatnak az endotélsejtek károsodásához, ezáltal számos szív- és érrendszeri

megbetegedés, így az érlemeszesedés kialakulásához is (Thirman és mtsai, 1994). E vegyületek nagy koncentrációban vannak jelen a cigarettafüstben, különösen az 1-metilantracén (1-MA) (1500 ng/cigaretta) és a fenantrén (PA) (362 ng/cigaretta) (Tithof és mtsai, 2002). Ezen anyagok agyi endotélsejtekre kifejtett hatásait legjobb tudomásunk szerint eddig még nem vizsgálták, a más sejttípusokon végzett kísérletek eredményeinek ismeretében azonban joggal feltételezzük, hogy a policiklusos aromás szénhidrogének is károsíthatják a vér-agy gátat. Néhány évvel ezelőtt ugyanis kimutatták, hogy a policiklusos aromás szénhidrogénekben gazdag cigarettafüst kondenzátum (cigarette smoke condensate, CSC) gátolja az endotélsejtek vándorlását (Snajdar és mtsai, 2001). Ezen túlmenően a kondenzátum humán köldökvéna endotélsejtek (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) esetében számos sejtfelszíni sejtadhéziós molekula, így az ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), az ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule 1) és a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) kifejeződését is indukálja (Shen és mtsai, 1996). A vizsgálati eredmények szerint a cigarettafüst kondenzátuma indukálja a protein kináz C aktivációját, amely fehérje által beindított jeltovábbító utak az NF-kappa B transzkripció faktor fokozott működése következtében bizonyos sejtfelszíni adhéziós molekulák kifejeződését a génjeik transzkripciójának fokozása által növelik. Az eredmények alapján a kondenzátum által kiváltott PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) foszforiláció kapcsolatban áll a vérben keringő monociták érendotélen keresztüli vándorlásával.

A már említett vegyületek mellett nem elhanyagolhatók a cigarettafüstben található szabadgyökök hatásai sem. Minden leheletnyi dohányfüst körülbelül 10^{15} számú szabadgyököt tartalmaz, többek között hidroxil és szuperoxid gyököket, hidrogén peroxidot és peroxinitritet is, amelyek által a dohányosok szervezetüket minden egyes belégzéskor igen komoly oxidatív stressznek teszik ki (Pryor és Stone, 1993). A cigarettafüstben megtalálható szabadgyökök egy része a gázfázisban található, ezek igen rövid féléletidejűek, emiatt főként a tüdő szövetét károsítják, a véráramba nehezen jutnak be. A kátrányban azonban olyan gyökök is találhatóak, amelyek órákig vagy akár hónapokig is stabilak maradnak, biológiai folyadékokban pedig autooxidálódnak és szuperoxid aniont, illetve hidrogén peroxidot szabadítanak fel (Pryor és Stone, 1993, Smith és Fischer, 2001, valamint Pryor és mtsai, 1998). A szabadgyökök direkt hatásán túl a dohányfüsttel belélegzett számos mérgező vegyület által generált gyulladáisos folyamatok is oxidatív stresszel terhelik a szervezetet (Van der Vaart és mtsai, 2004).

Már egyetlen cigaretta elszívása is jelentősen növeli az oxidatív stressz biomarkereinek mennyiségét a dohányosok szervezetében (Yamaguchi és mtsai, 2005). Rövid ideig cigaretta füstnek kitett marha tüdő artéria endotélsejtekben jelentősen nő a szuperoxid anion mennyisége (Jaimes és mtsai, 2004). A reaktív gyökök károsíthatják az érfali endotélsejtek fehérjéit, lipidjeit, DNS-ét, az endotélsejtek kóros működését eredményezhetik (Madamanchi és mtsai, 2005), ezáltal szerepet játszhatnak többek között az érlemezés kialakulásában is. Ezen ismeretek tükrében úgy gondoljuk, hogy a dohányfüst által (direkt vagy indirekt módon) kiváltott oxidatív stressz az agyi endotélsejtekre kifejtett hatásán keresztül szintén hozzájárulhat a vér-agy gát sérüléséhez, ami növelheti a központi idegrendszeri megbetegedések kockázatát a dohányosoknál.

CÉLKITŰZÉSEK

Az agyi kapillárisokat bélelő endotélsejtek alkotják az elsődleges védvonalat a keringés és a központi idegrendszer között. Ezek a sejtek a legkülönbélebb stresszhatásoknak vannak kitéve, így például ozmotikus, áramlási, oxidatív stressz, továbbá a pH, valamint glükóz- és ionkoncentrációk esetleges változásai is hatnak rájuk. E sejtek közvetlen kapcsolatba kerülnek a vérben keringő anyagokkal, amelyek közül számos eredményezi gyulladásos válaszreakciók beindulását. E folyamatok során sérülhetnek a szomszédos sejtek között kialakuló szoros és adherens kapcsolatok, aminek következtében fokozódik a vér-agy gát permeabilitása. Korábbi munkánk során a junkciók sérülését több, az agyi endotéliumot potenciálisan érintő stresszhatás, így hypoxia/reoxigenáció és hipoglikémia (Krizbai és mtsai, 2005), a kalcium ionok megvonása (Wilhelm és mtsai, 2007), valamint a hiperozmotikus stressz (Farkas és mtsai, 2005, illetve Wilhelm és mtsai, 2008) esetében is kimutattuk, és a stresszhatások közvetítésében szerepet játszó néhány jeltovábbító útvonalat is azonosítottunk.

Manapság egyre több adat bizonyítja, hogy a legkülönbélebb exogén és endogén anyagok által kiváltott stresszhatásokra kialakuló gyulladásos válaszreakciók beindításában a Toll-szerű receptorok is fontos szerepet játszhatnak (Gordon, 2002). Irodalmi adatok alapján ezen receptorok ligandjai is befolyásolhatják az agyi endotélsejtek működését (Singh és mtsai, 2007). Ismeretes továbbá, hogy a véráramba jutó exogén anyagok közül a dohányfüst több összetevője is képes lehet kiváltani gyulladásos reakciókat az endotélsejtekben (Wang és mtsai, 2000, valamint Nordskog és mtsai, 2003). Ezen információk tükrében munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Mely Toll-szerű receptorok fejeződnek ki az agyi endotélsejteken? Miképpen befolyásolják az agyi endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságait a TLR-ek által közvetített stresszhatások?

2. Miképpen hatnak az agyi endotélsejtek működésére a cigarettafüst egyes összetevői, így a nikotin és policiklusos aromás szénhidrogének?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vegyszerek és antitestek

Minden reagens, hacsak másként nincs jelölve, a Sigma Aldrich Kft. terméke. A kísérletek során a következő vegyületeket alkalmaztuk: U0126 (Cell Signaling Technology), pirrolidin ditiokarbamát (PDTC), 2,3-dimetil-1,4-naftokinon (DMNQ), nátrium-vanadát, zymosan A-, (Sigma), Pefabloc (Roche), protein G szefaróz (Amersham-Pharmacia Biotech). Kísérleteink során a következő antitesteket használtuk: anti-occludin, -claudin-5, -ZO-1, -ZO-2 (Zymed), anti-pan-cadherin, - α -catenin, - β -catenin, - β -actin (Sigma), torma peroxidázzal (HRP) kapcsolt anti-nyúl IgG (immunglobulin G, Thermo Scientific), Cy3- (karbocianin-3) kapcsolt anti-nyúl IgG és Cy2-kapcsolt anti-egér IgG (Jackson).

Sejtenyésztés és kezelések

Kísérleteinket izolált patkány agyi endotélsejteken, illetve egy immortalizált humán agyi endotélsejt vonal (hCMEC/D3: human cerebral Microvascular Endothelial Cells, D3 clonal population) tenyésztésén végeztük. Ezek a humán sejtek ugyanis *in vitro* körülmények között, gliasejtek nélkül is jól megőrzik a vér-agy gát tulajdonságokat (Weksler és mtsai, 2005). A humán sejteket a korábban leírtaknak megfelelően tartottuk fenn (Wilhelm és mtsai, 2008): patkányfarok kollagénnel bevont tenyésztő edényeken (Orange) vagy üveg fedőlemezeken EGM-2 (endothelial cell growth medium-2) Bullett Kittel (Cambrex) és 2,5% magzati marha szérummal (foetal bovine serum, FBS, Sigma) kiegészített EBM-2 (endothelial basal medium-2) tápfolyadékban (Cambrex) növesztettük őket.

A kísérletekhez használt patkány agyi endotélsejteket két hetes Wistar patkányokból izoláltuk. Az agyakat kis darabokra vágtuk, és két lépésben, II-es típusú kollagenázzal (Sigma), illetve kollagenáz/diszpáz (Roche) keverékével emésztettük, amit Percoll gradiens centrifugálás követett. A mikroér darabokat IV-es típusú kollagénnel és fibronektinnel bevont tenyésztőedényekbe, üveg fedőlemezekre, vagy filterekre (1,12 cm² felületű, 0,4 μ m pórusméretű Transwell Clear filter insert, Costar Corning) helyeztük. A sejteket 10% PDS-t (plasma derived serum, First Link) tartalmazó, 1 ng/ml bázikus fibroblaszt növekedési faktorról (basic fibroblast growth factor, bFGF, Roche), 100 μ g/ml

heparinnal, fiziológiás koncentrációban hidrokortizonnal és antibiotikumokkal kiegészített DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Sigma) tápfolyadékban növesztettük (Hoheisel és mtsai, 1998). Az első két napon a más sejttípusokkal történő szennyezés eltávolítása végett 4 µg/ml puromicint adtunk a tápfolyadékhoz (Perriere és mtsai, 2005). A tenyészetek 5-7 nap alatt konfluensek lettek, és ekkor, mint primér tenyészeteket használtuk fel őket a kísérletekhez. Az együttes primér tenyészetekhez felhasznált gliasejteket 2 napos Wistar patkányokból izoláltuk. Az agyhártyák eltávolítása után a cortexeket 10% FBS-t tartalmazó DMEM (Sigma) tápfolyadékban mechanikailag szétválasztottuk. A sejteket poli-L-lizinnel bevont 12 lyukú tenyésztőedényekbe (Costar) helyeztük, és a konfluencia elérése után használtuk fel őket.

A kísérletek során a konfluens agyi endotélsejt tenyészeteket szérummentes tápfolyadékban kezeltük 10, 50 vagy 100 µg/ml zymosan A-val. A zymosan kezelések mellett 5 µM DMNQ-val is kezeltük a sejteket. Egyes esetekben pedig a 100 µg/ml zymosannal együtt 10 µM U0126-ot, 100 µM PDTC-t vagy 5 µM DMNQ-t is adtunk a tápfolyadékhoz, a vegyületek együttes hatásainak vizsgálata érdekében. A nikotint 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, a fenantrént és az 1-metilantracént 30 µM végkoncentrációban adtuk az endotélsejtek tápfolyadékához. Végül a 10 µM-os nikotin kezelést 10 µM DMNQ-val is kiegészítettük, a vegyületek együttes hatásainak tesztelésére.

Permeabilitás mérések

A permeabilitás mérésekhez a primér patkány agyi endotélsejteket 0,4 µm pórusátmérőjű filtereken tenyésztettük, amelyeket asztrocitákat tartalmazó tenyésztőedénybe tettük. A konfluens tenyészeteket 24 órán keresztül együtt növesztettük az asztrocitákkal hidrokortizon, CPT-cAMP (8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfát) és 4-(3-butoxi-4-metoxibenzil)imidazolidin-2-on (Sigma) jelenlétében addig, amíg a sejtrétegek magas elektromos ellenállási értékeket nem mutattak. A zymosan és a DMNQ-val kombinált zymosan kezeléseket a következő napon végeztük, szérummentes DMEM/F12 tápfolyadékban.

Az agyi endotélsejtek gát funkciójának teszteléséhez mértük a konfluens tenyészetek permeabilitását. A transzendoteliális anyagáramlás vizsgálatára a 376 Da molekulatömegű nátrium fluoresceint (sodium fluorescein, SF), és a 67 kDa molekulatömegű Evans kékekkel jelölt albumint (Evans blue labeled albumin, EBA) alkalmaztuk. A sejteket Ringer-Hepes oldattal mostuk (150 mM NaCl, 5,2 mM KCl, 2,2

mM CaCl₂, 0,2 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2,8 mM D-glükóz, pH=7,4). A filterek alsó (abluminális) részéhez Ringer-Hepes-t, míg a felső, luminális oldalhoz 10 µg/ml nátrium fluoresceint, 170 µg/ml Evans kéket és 10 mg/ml marha szérum albumint (BSA) tartalmazó Ringer-Hepes oldatot adtunk. A sejteket enyhén rázva, 37°C-on egy órán át inkubáltuk, majd az abluminális térrészből mintát vettünk. Az SF és az EBA koncentrációját fluoriméterrel határoztuk meg (FLUOstar Optima microplate reader, BMG Labtechnologies), 485/520 nm-es excitációs/emissziós hullámhosszon a nátrium fluorescein és 584/680 nm-en az Evans kék albumin esetében. A permeabilitási együtthatót a következő egyenlet szerint számoltuk ki:

$$P = \frac{dQ}{dT \cdot A \cdot C_0},$$

ahol dQ a transzportált anyagmennyiség, dT az inkubációs idő, A a filter felszíne, C₀ a kezdeti koncentráció a luminális térrészben. A számított P_{teljes} értékeket összevetettük a P_{filter} értékkel és a valódi P_e (endoteliális permeabilitási együttható) értéket az alábbi egyenlet szerint számítottuk:

$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_{teljes}} - \frac{1}{P_{filter}}.$$

A transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

A gát funkció vizsgálatára egy másik módszert, a transzendoteliális elektromos ellenállás (transendothelial electrical resistance, TEER) mérését is alkalmaztuk. Az endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságainak erősítése érdekében a sejteket ezen mérésekhez is asztrocitákkal tenyésztettük együtt hidrokortizon, CPT-cAMP (8-(4-klorofeniltio)-adenozin-3',5'-ciklikus monofoszfát) és 4-(3-butoxi-4metoxibenzil) imidazolidin-2-on (Sigma) jelenlétében (Dehouck és mtsai, 1990).

A konfluens endotélrétegek ellenállási értékeit bot elektródok segítségével és EVOM epiteliális Volt-Ohm méterrel (World Precision Instruments) mértük. Az ellenállás értékeket átlagoltuk, majd levontuk az üres filterek értékeinek átlagát. Az eredményeket a Microsoft Excel 2000 program segítségével dolgoztuk fel, az ellenállás értékeket pedig Ω*cm²-ben fejeztük ki.

Valós idejű polimeráz láncreakció

A valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR) vizsgálatokhoz kezelt és kezeletlen sejtek teljes RNS készletét TRIzol reagenssel (Invitrogen) izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A genomi DNS-sel való szennyeződés elkerülése érdekében az RNS-t DNáz enzimmel (Roche) kezeltük. A Bio-Rad iQ5 készüléken végzett amplifikáció minden ciklusa három lépéses volt (95°C, 15 mp, 56°C, 30 mp, 72°C, 30 mp). A polimeráz láncreakció során alkalmazott primereket az 1. számú táblázat foglalja össze. A PCR során belső kontrollként gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) alkalmaztunk. A fluoreszcens jel detektálásához a küszöbértéket és a kvantifikálást a készülék saját szoftverével végeztük. A génexpresszió változásait a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel értékeltük ki, az eredményeket pedig a Microsoft Excel 2000 program segítségével ábrázoltuk.

Név	5'-3' primer	3'-5' primer	Termék (bázispár)
Humán TLR			
TLR1	GCCTTGCTATACACCAAGT	CCAATTGTTGCAGAGACTTC	310
TLR2	TCTCCCATTTCCGTCTTTT	GGTCTTGGTGTTCAATTATCTTC	125
TLR3	TAAACTGAACCATGCACTCT	TATGACGAAAGGCACCTATC	101
TLR4	CCGCTTCCTGGTCTTATCAT	TCTGCTGCAACTCATTTTCAT	141
TLR5	ACGGACTTGACAACCTCCAA	AGTGATGAGGTTCTGCTGTA	291
TLR6	CCCAAGGAGAAAAGCAAAC	TTCACCATCATCCAAGTAAAT	156
TLR7	CAGAGCTGAGATATTTGGACT	TTGGTAAGTATCTGTTATCACCT	308
TLR8	CGGCAGAGTTATGCAAATAGT	GTAAGAGCACTAGCATTATCA	341
TLR9	GGCAAAGTGGGCGAGATGAG	AGTGGTGGTTGTCCCTGGTC	483
TLR10	CTCCCAACTTTGTCCAGAAT	TGGTGGAATGCAATAGAAT	132
Patkány TLR			
TLR1	TACCCTGAACAACGTGGACA	ATCGACAAAGCCCTCAGAGA	165
TLR2	GGAGACTCTGGAAGCAGGTG	CGCCTAAGAGCAGGATCAAC	245
TLR3	AGCCTTCAACGACTGATGCT	GGAAATTAACGGGACCACCT	232
TLR4	CCAGAGCCGTTGGTGTATCT	TCAAGGCTTTCCATCCAAC	239
TLR5	GCCAGACCAGATTGAAGTC	TGTGAATCTCGTTGGCAGAG	168
TLR6	GTCTCCCCACTTCATCCAGA	CCCACGTTTACCCTTCTCAA	208
TLR7	AGCTCTGTTCTCCTCCACCA	CATGGGTGTTTGCTATCG	194
TLR8	TAGTGGAATCGCCTTGACC	AAGCCAGCAGGTAGGTGAGA	348
TLR9	TCAACAAGAACACGCTCAGG	GAGAGCTGGGGTGAGACTTG	239
TLR10	GATTGTCACCATTTGTGCTGG	AGACAGAATCATGTGCAGCG	203
GAPDH	GTGAAGGTCGGTGTCAACG	GTGAAGACGCCAGTAGACTC	300

1. táblázat: a polimeráz láncreakciókhoz használt primerek

A fehérjeminták előkészítése és Western blot

Az agyi endotélsejtek konfluens tenyészeit különböző vegyületekkel kezeltük, majd PBS-sel mostuk le róluk a tápfolyadékot, és a sejteket jéghideg homogenizáló pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% NP-40 (Nonidet P-40), 2 mM CaCl₂, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ és 1 mM Pefabloc) sejtkaparóval mechanikailag feltártuk, majd egy órán át jégen állni hagytuk. A sejtörmeléket ezután 10 perces centrifugálással (10000 g, 4°C) ülepitettük és a felülúszóval dolgoztunk tovább. Az egyes mintákban a fehérje koncentrációt BCA módszerrel (Bicinchoninic Acid Assay Kit, Pierce) határoztuk meg, az eltérő koncentrációjú mintákat pedig homogenizáló pufferrel kiegyenlítettük, így a Western blot során minden esetben azonos fehérje koncentrációjú mintákkal dolgoztunk. Ezután a mintákhoz Laemmli-féle denaturáló SDS-mintapuffert (12 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% glicerin, 0,4% nátrium dodecil szulfát (SDS), 2,88 mM 2-merkaptoetanol, 0,02% brómfenolkék) adtunk, amit 3 perc 95°C-on történő denaturáció követett. A Triton X-100 oldékony, illetve oldhatatlan frakciójú minták előkészítése során a sejteket 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM Na ortovanadát és 1 mM Pefabloc (Roche) összetételű pufferrel homogenizáltuk, majd a centrifugálást követően az üledéket Laemmli-féle mintapufferbe vettük fel (Triton X-100 oldhatatlan frakció), míg a felülúszó, amelyhez szintén adtunk Laemmli-féle mintapuffert, a Triton X-100 oldékony frakció volt. A Western blot kísérleteket megelőzően ezeket a mintákat is denaturáltuk 95°C-on 3 percig.

A fehérjéket szabványos denaturáló SDS-polikarilamid gélelektroforézissel (Laemmli, 1970) választottuk szét Bio-Rad készüléken (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad), az alábbi összetételű pufferben: 25 mM Tris, 192 mM glicin és 0,1% SDS. A poliakrilamid gélekben lévő fehérjéket nagy fehérjekötő kapacitással rendelkező PVDF (polivinildén fluorid, Pall) vagy nitrocellulóz (GE Healthcare) membránokra blottoltuk (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). A transzfer puffer 15,6 mM Tris és 120 mM glicint, valamint 20% metanolt tartalmazott. A membránok nonspecifikus kötőhelyeit 5% kazeint (sovány turista tejpor) vagy (a claudin-5 esetében) 3% BSA-t tartalmazó TBS-T (Tris buffered saline, 0,1% Tween 20 detergenssel) oldatban blokkoltuk 30 percen keresztül. Ezt követte a membránok jelölése a megfelelő antitestekkel TBS-T oldatban másfél órán keresztül. Ehhez a következő antitesteket használtuk TBS-T-ben a megfelelő hígításban: anti-pan-cadherin: 1:2000, anti- α -catenin: 1:1000, anti- β -catenin: 1:2000, anti- β -actin: 1:5000, anti-claudin-5: 1:500, anti-occludin: 1:1000, anti-ZO-1: 1:500, anti-ZO-2:

1:500. A membránhoz nem kötődött antitesteket háromszor 10 perces TBS-T-vel történő mosással távolítottuk el, majd a másodlagos antitestekkel történő inkubáció következett 1:5000 higítási arányban, szintén TBS-T-ben. Újabb háromszor 10 perces mosást követően az immunreakciót kemilumineszcens reagens segítségével (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) röntgenfilmen (Agfa) vizualizáltuk.

Immunkicsapás

Az immunkicsapáshoz a sejteket az előzőekben ismertetett összetételű homogenizáló pufferben sejtkaparóval tártuk fel. A mintákat egy órás jégen történő inkubációt követően lecentrifugáltuk és a továbbiakban a felülúszóval dolgoztunk. A felülúszók koncentrációit kiegyenlítettük, majd 1 órát inkubáltuk protein G-szefaróz gyöngyökkel a nem specifikusan kötődő fehérjék eltávolítására. A mintákat 2-5 µg β-catenin antitesttel reagáltattuk folyamatos keverés mellett (4°C, 4 óra). Ezt követte a kialakult immunkomplexek kicsapása a szefaróz gyöngyökkel 4 °C-on, egész éjszakán át folyamatosan kevertetve. A mintákat másnap négyszer mostuk jéghideg homogenizáló pufferben, majd Laemmli-féle mintapufferben 3 percig 95°C-on denaturáltuk az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist megelőzően.

Immunfluoreszcens festés

Az immunfluoreszcens festésekhez a primér patkány agyi endotélsejteket kollagén/fibronektin keverékével bevont üveg fedőlemezekre tenyésztettük. A kezeléseket követően a sejtrétegeket -20°C-os etanol:ecetsav 95:5 arányú keverékével 10 percig történő inkubációval rögzítettük, amit három, egyenként 5 perces mosás követett PBS-sel. A 3% BSA-t tartalmazó PBS-sel történő fél órás blokkolást követően a fedőlemezeket elsődleges antitestekkel inkubáltuk másfél órán át a megfelelő higításban, 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben: anti-occludin: 1:100, anti-claudin-5: 1:100 és anti-ZO-1: 1:100. A festéseket Cy3-, illetve Cy2-kapcsolt másodlagos antitestekkel (1:500, 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben, 30 perc) vizualizáltuk, amit háromszor öt perces mosás követett PBS-sel. A fedőlemezeket a jel elhalványodását csökkentő beágyazó folyadékkal (anti-fading mounting medium, Biomeda) rögzítettük a tárgylemezekre. A jelölt fehérjék eloszlását egy digitális kamerával (Spot RT KE, Diagnostic Instruments) összekötött, epifluoreszcens mikroszkóp (Nikon Eclipse TE2000U) segítségével vizsgáltuk.

Statisztikai elemzés

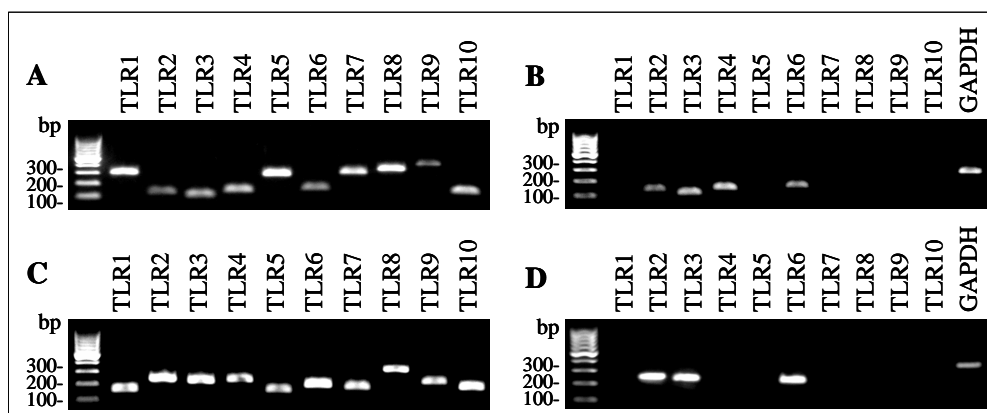
A feltüntetett adatok minden esetben három független biológiai mintán mért értékek átlagai és szórásai. Az adatok elemzésekor egy szempontos ANOVA elemzést végeztünk Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. Minden esetben a $P \leq 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

Az agyi endotélsejtek Toll-szerű receptorainak vizsgálata

A Toll-szerű receptorok kifejeződése az agyi endotélsejteken

Néhány irodalmi adat tanúsága szerint egyes Toll-szerű receptorok az agyi endotélsejteken is kifejeződnek. Ezért kísérletsorozatunk első lépéseként RT-PCR technikával megvizsgáltuk, hogy a hCMEC/D3 humán agyi endotélsejt vonal sejtjei, valamint az izolált patkány agyi endotélsejtek a TLR1-10 receptorok közül melyeket fejezik ki. Az alkalmazott patkány TLR primerek tesztelésére patkány tüdő szöveti teljes RNS mintából végeztünk amplifikációt (3/C ábra), míg a humán primerek funkcionalitását A549 tüdőepitél sejt vonal sejtjeinek teljes RNS készletéből végzett PCR-rel vizsgáltuk (3/A ábra). Ezekben a patkány és humán mintákban ugyanis mind a 10 Toll-szerű receptor kifejeződése ismert (Hou et al., 2006). Mindkét esetben, mind a 10 primerrel végzett amplifikáció eredményesnek bizonyult. Az endotélsejteken végzett vizsgálatok tanúsága szerint a humán agyi endotélsejtek a TLR2, 3, 4 és 6 (3/B ábra), míg a patkány sejtek a TLR2, 3 és 6 receptorokat fejezik ki alapesetben (3/D ábra). A TLR4 kifejeződését ugyanakkor az utóbbi mintában nem észleltük.



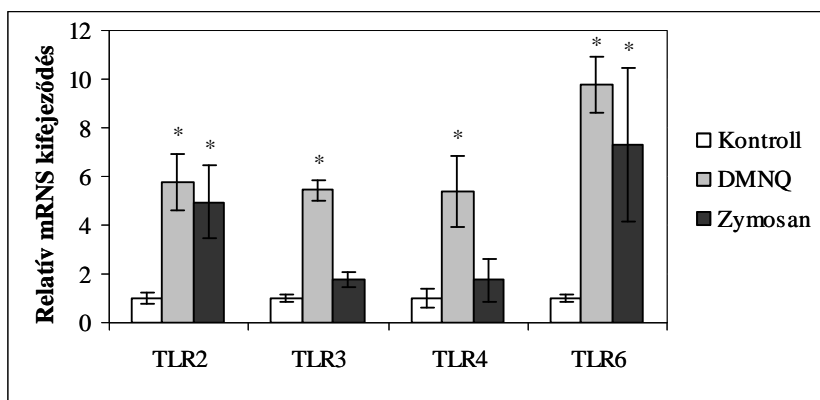
3. ábra: A Toll-szerű receptorok kifejeződése humán és patkány agyi endotélsejtekben

Humán A549 (A) és hCMEC/D3 sejt vonalak sejtjei (B), valamint patkány tüdő szövet (C) illetve izolált patkány agyi endotélsejtek (D) teljes RNS készletét izoláltuk és polimeráz láncreakcióval a TLR mRNS-ek jelenlétét vizsgáltuk. A PCR termékeket agaróz gélben végzett elektroforézissel elválasztottuk, és etídium-bromiddal vizualizáltuk. Az amplikonok méretének meghatározásához 100 bázispáros DNS létrát használtunk. A képek 5 független kísérlet reprezentánsai.

Stresszfaktorok hatásai az endoteliális Toll-szerű receptorok transzkripciójára

A fertőzések és a gyulladásos folyamatok során a sejtekben bekövetkező metabolikus változások gyakran eredményeznek oxidatív stresszt. Ennek okán RT-PCR technikával megvizsgáltuk, hogy a humán agyi endoteliális TLR mRNS-ek transzkripciója miképpen változik oxidatív stressz hatására. Az oxidatív stressz modellezéséhez DMNQ-val kezeltük a konfluens sejtenyészeteket. A DMNQ egy, a reaktív oxigén gyökök hatásainak vizsgálatára a szakirodalomban széles körben alkalmazott vegyület, és csoportunk is sikeresen alkalmazta már agyi endotélsejteken (Krizbai és mtsai, 2005). A DMNQ a sejtekbe jutva szuperoxid anion és hidrogén-peroxid felszabadulását eredményezi (Shi és mtsai, 1994). Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a 24 órán át tartó 5 μ M koncentrációjú DMNQ kezelés hatására mind a négy Toll-szerű receptor mRNS-ének kifejeződése szignifikáns mértékben növekedett: a TLR2 és 3 transzkripciója a kezeletlen sejtek színjének több, mint ötszörösére, a TLR4-é négyszeresére, a TLR6-é pedig hatszorosára emelkedett (4. ábra).

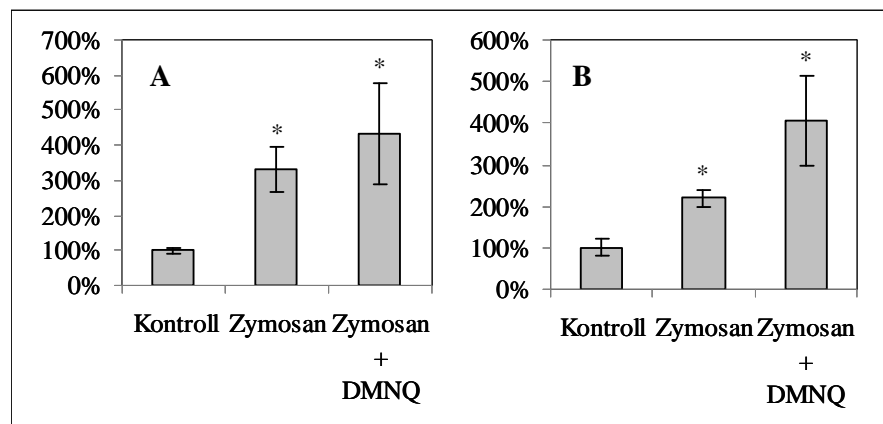
Az azonosított receptorok közül a TLR6 kifejeződését jelenlegi ismereteink szerint még senki sem írta le agyi endotélsejtekben. Mivel a mai napig semmilyen adat nem áll rendelkezésünkre a TLR6 agyi endotélsejtekben betöltött szerepéről, természetesen kíváncsiak voltunk a TLR6 aktiválódásával beinduló folyamatokra. Ennek vizsgálatára egy specifikus TLR6 agonistával, zymosannal (100 μ M) kezeltük a sejteket. Lévéen a TLR6 aktivációja során heterodimert képez a TLR2-vel, a zymosan kezelés hatására épp e két receptor mRNS-ének transzkripciója növekedett jelentős mértékben: a TLR2-é ötszörösére, a TLR6-é pedig hétszeresére. Ugyanakkor a TLR3 és 4 esetében nem tapasztaltunk változásokat a kezeletlen sejteknél megfigyelt transzkripciós szintekhez képest (4. ábra). Ezeket a kísérleteket a többi Toll-szerű receptorral is elvégeztük, de egyik esetben sem indukálódott az mRNS kifejeződés kimutatható mértékben (be nem mutatott eredmény).



4. ábra: A humán agyi endotél TLR mRNS-ek transzkripciójának indukálása két stresszfaktor által
A konfluens tenyészeteket 5 μ M DMNQ-val, illetve zymosannal (100 μ g/ml) kezeltük 24 órán keresztül. Kontroll reakcióra GAPDH-t használtunk és az mRNS-ek kezeletlen hCMEC/D3 sejtekéhez képesti relatív kifejeződését $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számítottuk ki. Minden egyes PCR-t három független kísérletben ismételtük meg. A grafikonon ábrázolt eredmények a három független kísérlet eredményeinek átlag és szórás értékeit mutatják be.

A transzendoteliális permeabilitás változása zymosan hatására

Eddigi eredményeink elsőként szolgáltatnak információt a TLR6 agyi endoteliális kifejeződését illetően. Bizonyítottuk továbbá, hogy egy specifikus TLR2/6 agonista, a zymosan hatására e TLR gének transzkripciója jelentős mértékben emelkedik, ami a receptorok aktivációjára utal. Egy korábbi munkánk során (Veszélka és mtsai, 2007) kimutattuk, hogy egy másik Toll-szerű receptor ligand, az LPS növeli az endotél tenyészetek permeabilitását, éppen ezért kíváncsiak voltunk, hogy a zymosan is befolyásolja-e az agyi endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságait. A sejtek gát funkciójának tesztelésére a primér patkány agyi endotélsejtek konfluens tenészeit 100 μ g/ml zymosannal kezeltük 24 órán át. A kezelés hatására a paracelluláris anyagáramlás jelzőjeként alkalmazott nátrium fluoreszcein transzendoteliális permeabilitása háromszorosára, míg a transzcelluláris transzport jelzőanyaga, az Evans kék-albumin permeabilitása kétszeresére növekedett. Mivel a fertőzésekhez gyakran oxidatív stressz is társul, e folyamatok modellezésére a zymosan kezelést 5 μ M DMNQ-val kombináltuk. A két anyag együttes hatásának eredményeképpen mindkét jelzőanyagra nézve tovább nőtt a tenyészetek transzendoteliális permeabilitása. Ezek az adatok arra utalnak, hogy már önmagában a zymosan hatására is erősen sérülnek az endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságai, e TLR2/6 agonista hatását pedig az oxidatív stressz még tovább fokozza (5. ábra).

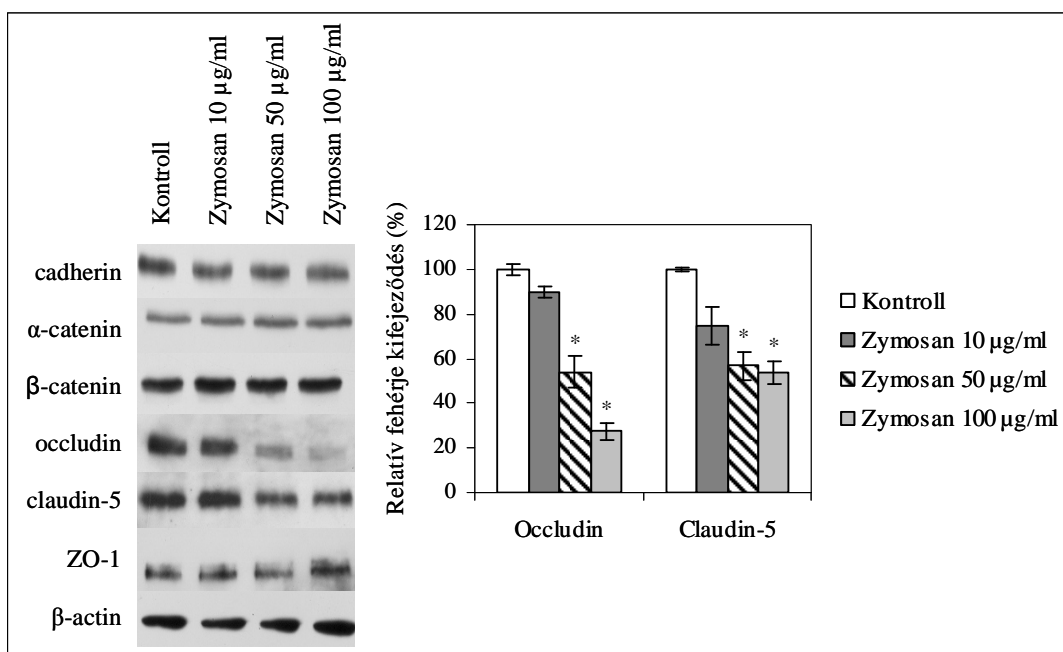


5. ábra: A zymosan hatása az agyi endotél tenyészetek permeabilitására

A primér patkány agyi endotélsejtek konfluens tenyészeit zymosannal (100 µg/ml) és zymosan+DMNQ (100 µg/ml és 5µM) keverékével kezeltük, majd mértük a nátrium fluoreszcein (A) és az Evans kék-albumin (B) transzendoteliális permeabilitásának változását. Az adatok három független kísérlet eredményeinek átlag és szórás értékeit mutatják. A zymosan és a zymosan+DMNQ kezelt csoportok, valamint a kezeltlen sejtek permeabilitása közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket ($P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

A zymosan hatása a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésére

Az endotélsejtek kapcsolatait alkotó fehérjék döntően befolyásolják a transzendoteliális permeabilitást. Mivel a zymosan hatására nagymértékben nőtt a sejtenyészetek permeabilitása, ezért megvizsgáltuk, hogy megváltoztatja-e a zymosan a sejtkapcsoló fehérjék mennyiségét a sejtekben. Ennek érdekében a hCMEC/D3 sejteket 10, 50 és 100 µg/ml koncentrációjú zymosannal kezeltük 24 órán át. A Western blot elemzés eredményei szerint a szoros kapcsolatok két transzmembrán alkotóelemének, az occludinnak és a claudin-5-nek a mennyisége a sejtekben a zymosan koncentrációjától függő módon, szignifikáns mértékben csökkent. Más sejtkapcsoló fehérjék, így a ZO-1, a cadherin, valamint az α - és β -catenin esetében nem tapasztaltunk eltéréseket a kezeltlen sejtekhez képest (6. ábra).

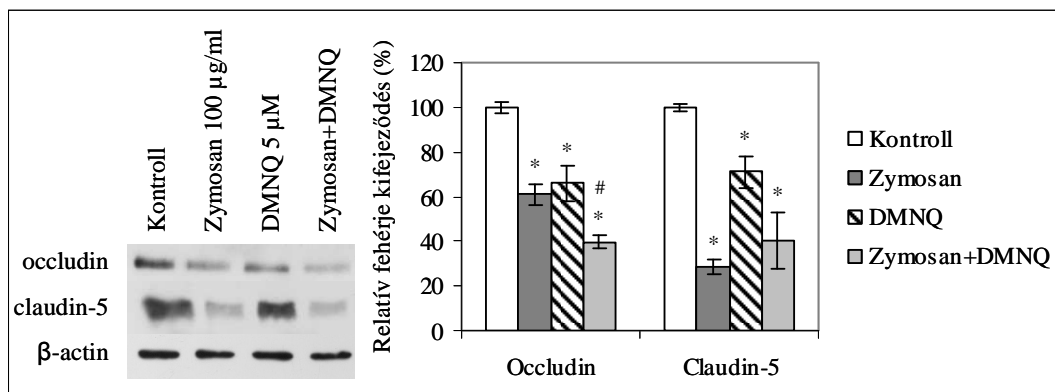


6. ábra: A sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésének változása a zymosan kezelés hatására

A hCMEC/D3 tenyészeteket 10, 50 és 100 μ g/ml koncentrációjú zymosannal kezeltük 24 órán keresztül. A bemutatott blottok három független kísérlet reprezentánsai. Mindegyik fehérje sávot denzitometráltuk és a β -aktinhoz normalizáltuk. A grafikon három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A statisztikailag szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

A zymosan és az oxidatív stressz együttes hatása a sejtkapcsoló fehérjékre

Mivel a permeabilitási tesztek során a DMNQ kezelés erősítette a zymosan hatását, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon e kettős kezelés milyen hatással van sejtkapcsoló szerkezetek felépítő fehérjék kifejeződésére. A hCMEC/D3 sejtek occludin és claudin-5 fehérjéinek mennyiségét a DMNQ (5 μ M, 24 óra) kisebb mértékben csökkentette, mint a zymosan (100 μ g/ml). A legkifejezettebb hatással a két anyag kombinációja volt az occludin mennyiségére. Ugyanakkor a claudin-5 esetében megfigyelt változások hasonlóak voltak a zymosan kezelés eredményeihez (7. ábra).

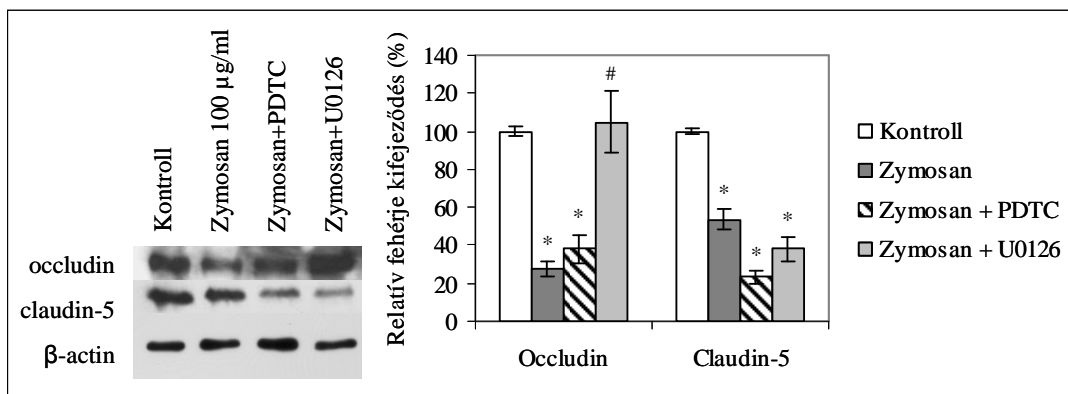


7. ábra: A zymosan és a DMNQ együttes hatása a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésére

A humán agyi endotélsejteket 100 µg/ml koncentrációjú zymosannal, illetve 5 µM DMNQ-val kezeltük 24 órán át, egyes esetekben pedig a két anyag kombinációját használtuk. Az ábrán három független Western blot kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak. Az egyes fehérje sávok intenzitását denzitometráltuk és β-aktinhoz normalizáltuk. A grafikon három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A kontrollhoz viszonyítottan statisztikailag szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillaggal, míg a zymosan kezeléshez képesti különbségeket ($P < 0,05$) kettős kereszttel jelöltük.

A sejtkapcsoló szerkezetek változásainak mechanizmusa

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, milyen folyamatok vezetnek a zymosan általi TLR2/6 aktivációtól a szoros kapcsolatok fehérjei mennyiségének változásáig, a sejteket a TLR jeltovábbító útvonal ismert elemeinek gátlószereivel kezeltük. Az NF-κB transzkripció faktor gátlásának (10 µM PDTC) nem volt hatása a sejtkapcsoló fehérjék esetében leírt változásokra. Az U0126 (100 µM) nevezetű ERK1/2 MAP kináz gátlószer ugyanakkor teljes mértékben kivédte a zymosan occludinra kifejtett hatását, a claudin-5 mennyiségi csökkenését azonban továbbra sem volt képes megakadályozni (8. ábra).

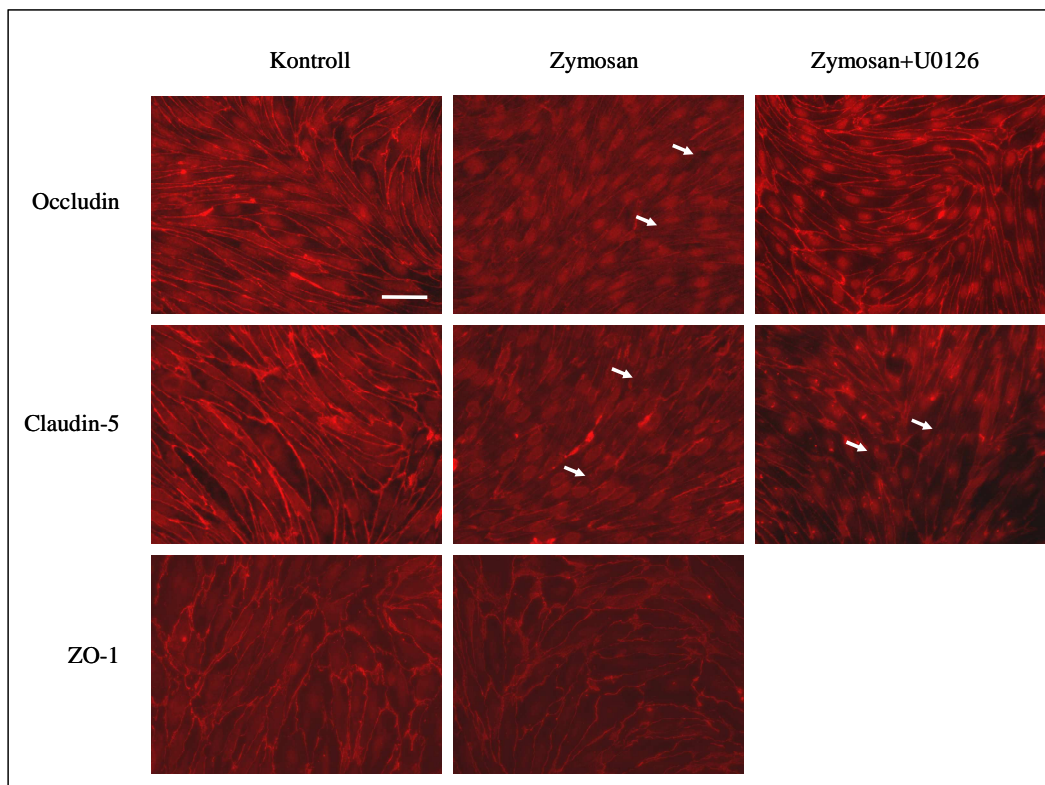


8. ábra: A zymosan sejtkapcsoló fehérjékre kifejtett hatásának mechanizmusa

A hCMEC/D3 sejteket zymosannal (100 µg/ml) és zymosan+PDTC (NF-κB gátlószer, 100µM), illetve zymosan+U0126 (ERK1/2 kináz gátlószer, 10µM) kombinációjával kezeltük 24 órán át. Az ábra három független Western blot kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja be. Az egyes fehérje sávok intenzitását denzitometráltuk és a β-aktinhez normalizáltuk. A grafikon három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A kezeletlen sejtekhez viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillaggal, míg a zymosan kezeléshez képest tapasztalt szignifikáns eltéréseket ($P < 0,05$) kettős kereszttel jelöltük.

A zymosan hatása a sejtkapcsoló fehérjék elhelyezkedésére

A sejtkapcsoló fehérjék esetében tapasztalt mennyiségi változásokon túl azt is látni szeretnénk volna, hogy a fehérjék sejten belüli elhelyezkedésére is hatással van-e a TLR2/6 agonista. Western blot eredményeinket immunfluoreszcens vizsgálataink is megerősítették. A 9. ábrán jól látható ugyanis, hogy az occludin és a claudin-5 fehérjék kezeletlen sejtek esetében tapasztalható folytonos membránfestése a zymosan kezelés (100 µg/ml, 24 óra) hatására szakadozottá válik, vagyis ezek az alkotóelemek számos helyen eltűnnek a szoros kapcsolatok területéről. Ugyanakkor a ZO-1 fehérje sejten belüli elhelyezkedésére nem volt hatással a zymosan kezelés. Az U0126 nevezetű ERK1/2 kináz gátlószer teljes mértékben kivédte a zymosan occludinra kifejtett hatását, míg a claudin-5 fehérje elhelyezkedésének megváltozását nem akadályozta meg.

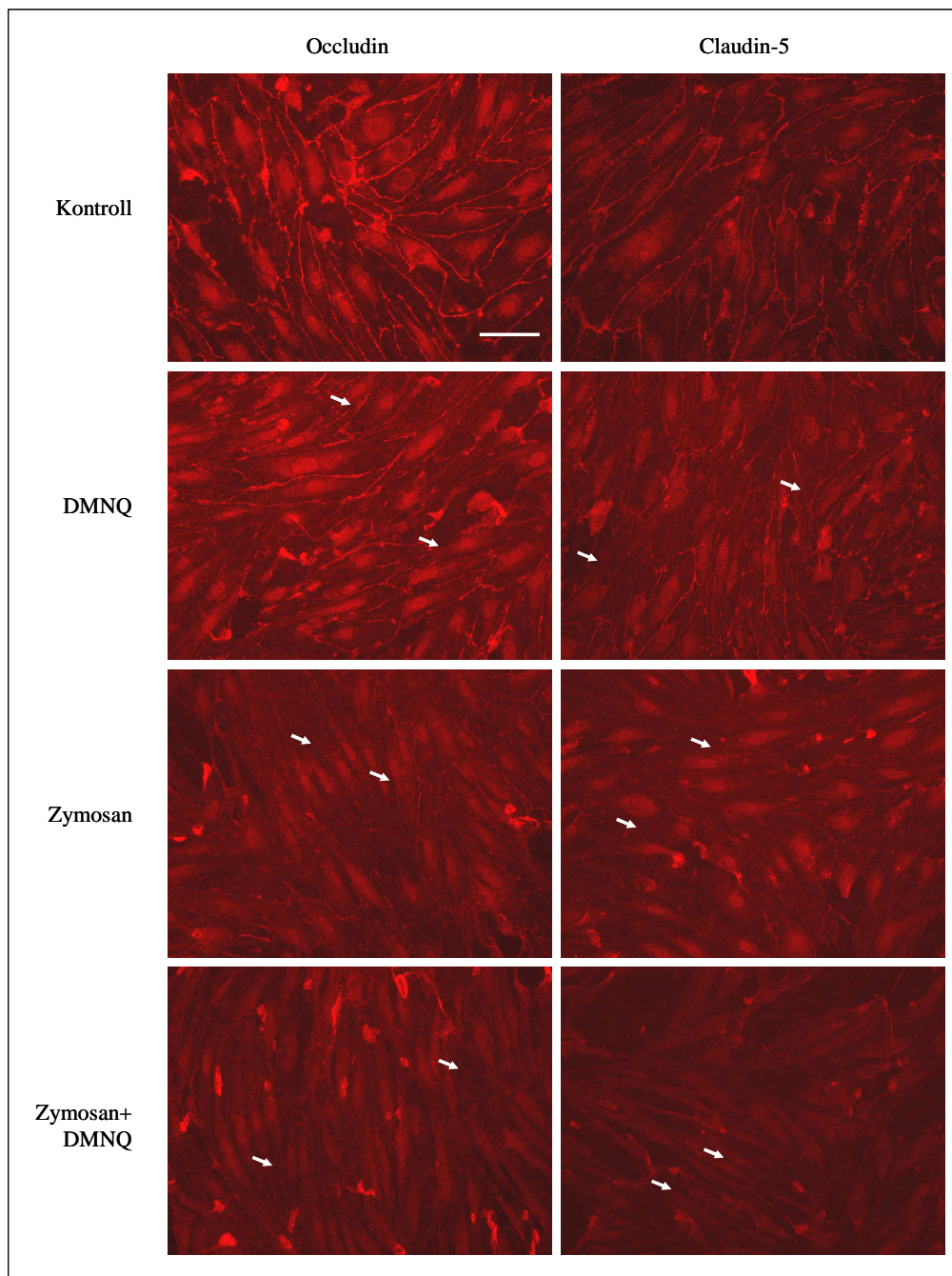


9. ábra: A sejtkapcsoló szerkezetek alkotóelemei sejten belüli elhelyezkedésének változásai zymosan kezelés hatására

A humán agyi endotélsejteket 100 µg/ml koncentrációjú zymosannal, illetve zymosan és U0126 (10 µM) kombinációjával 24 órán át kezeltük, majd a sejteket rögzítettük, és az occludin, a claudin-5, valamint a ZO-1 fehérje elhelyezkedését karbocianinnal kapcsolt ellenanyagokkal tettük láthatóvá. A fluoreszcens mikroszkópos felvételek három független kísérlet eredményeinek reprezentánsai. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a fehérjék eltűntek a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Mérc=50 µm.

A zymosan és az oxidatív stressz együttes hatása a sejtkapcsoló fehérjék eloszlására

A Western blot eredmények alapján úgy tűnt, a zymosan hatását erősíti a DMNQ kezelés. Ezért azt is megvizsgáltuk, miképpen befolyásolják ezek az anyagok az occludin és a claudin-5 sejten belüli elhelyezkedését. A konfluens tenyészetek folytonos membránfestése a DMNQ kezelés (5 µM, 24 óra) hatására mindkét fehérje esetében szakadozottá vált. A zymosan kezelés esetében pedig még több helyen eltűntek a fehérjék a sejt-sejt kapcsolatok területéről. Az occludin elhelyezkedésében a legkifejezettebb változásokat a kombinatív kezelésnél tapasztaltuk, lévén a fehérje membránfestése szinte teljes mértékben eltűnt, ugyanakkor a claudin-5 esetében megfigyelt változások hasonlóak voltak a zymosanéhoz (10. ábra).



10. ábra: A sejtkapcsoló fehérjék eloszlása a zymosan és DMNQ kezelések hatására

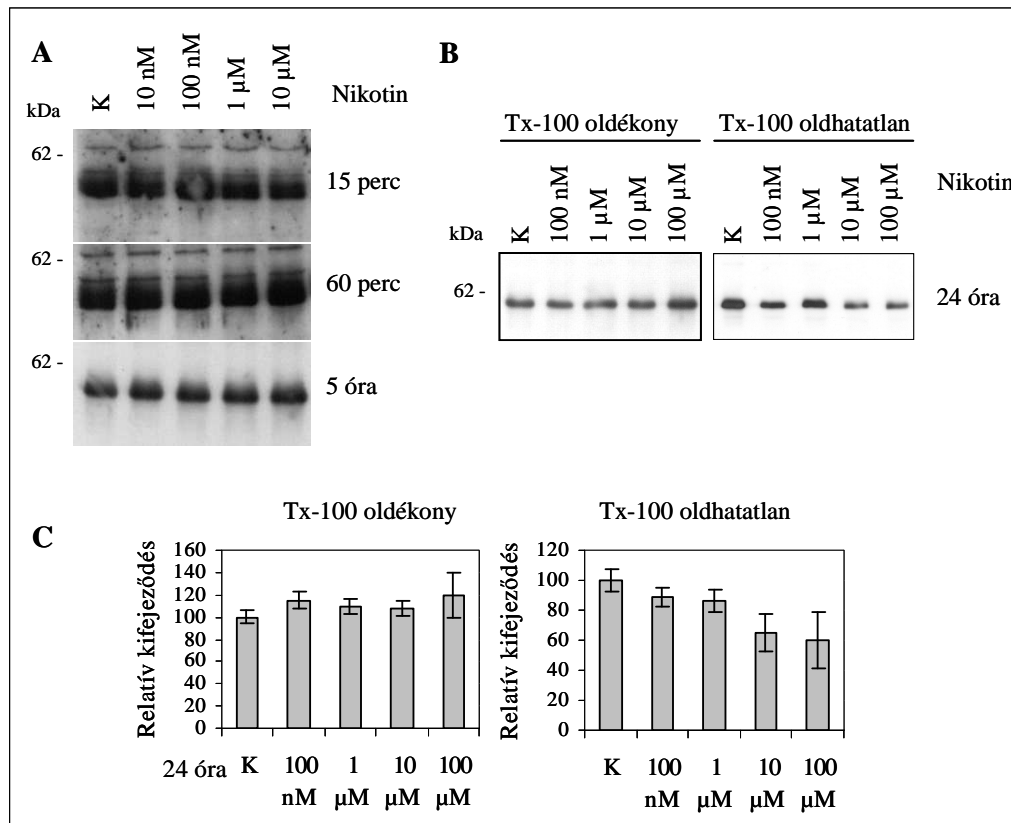
Az agyi endotélsejtek konfluens tenyészetét 100 µg/ml koncentrációjú zymosannal, illetve 5 µM DMNQ-val, ezen kívül a két anyag keverékével is kezeltük 24 órán át. A sejteket rögzítettük és occludin, valamint a claudin-5 elleni antitesttel festettük. A fluoreszcens mikroszkópos felvételek három független kísérlet eredményeinek reprezentánsai. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a fehérjék eltűntek a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Mérc=50 µm.

A dohányfüst összetevőinek hatásai az agyi endotélsejtekre

Számos irodalmi adat bizonyítja, hogy a cigarettafüst egyes alkotóelemei, így a nikotin és több policiklusos aromás szénhidrogén is káros hatással van szervezetünkre. A vér-agy gát alapját képező agyi endotélsejtekre gyakorolt hatásuk azonban jórészt ismeretlen. Tekintve, hogy a dohányosok esetében a központi idegrendszeri betegségek kialakulásának kockázata jóval nagyobb, mint a nemdohányzóknál, továbbá az is ismeret tény, hogy a vér-agy gát számos központi idegrendszeri betegség esetében érintett (Abbott és mtsai, 2010), meglepő, hogy mindeztáig ilyen kis figyelmet fordított a szakma a dohányfüst vér-agy gátra gyakorolt hatásainak vizsgálatára.

A nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének hatásai az agyi endotélsejtek közötti kapcsolatokra

Munkánk során megvizsgáltuk, milyen hatással vannak ezek a vegyületek az agyi endotélsejtek szerkezetére és funkciójára, különös tekintettel a gát funkció kialakítása szempontjából nélkülözhetetlen szoros és adherens kapcsolatokra. Vizsgálatainkat minden esetben izolált patkány agyi endotélsejtek tenyészetin végeztük. Elsőként azt tanulmányoztuk, hogy a nikotin miképpen befolyásolja a szoros kapcsolatok egyik transzmembrán alkotóelemének, az occludinnak a kifejeződését. A rövid idejű (15 perces, 60 perces és 5 órás) kezelések esetében a nikotin a dohányosok vérében mért koncentrációnál (200 nM) (Russell és mtsai, 1980) kisebb, vagy ahhoz hasonló koncentrációkban (10, illetve 100 nM) alkalmazva nem volt hatással az occludin mennyiségére. Mivel a patkányok kevésbé érzékenyek a nikotinra, mint az ember (az LD₅₀ érték patkányok esetében 50 mg/kg, míg embernél 0,5-1 mg/kg) (Okamoto és mtsai, 1994, valamint Gosselin, 1988), ezért nagyobb nikotin koncentrációk (1-100 µM) hatásait is teszteltük. A vegyület azonban rövid idejű kezelések során még 10 µM-os koncentrációban sem változtatta meg a fehérje mennyiségét (11/A ábra). A kezelési idő növelése során azt tapasztaltuk, hogy 24 óra elteltével 10 és 100 µM-os koncentrációban adott nikotin hatására viszont az occludin mennyisége csökkent a Triton X-100 oldhatatlan frakcióban (11/B ábra).



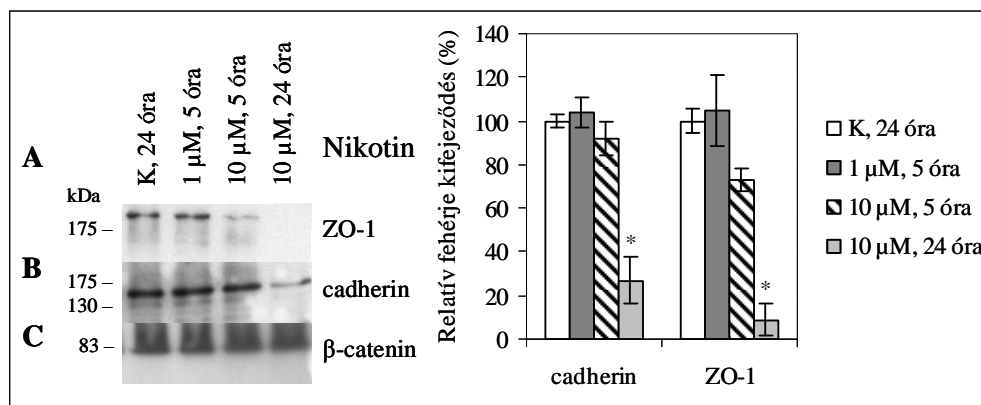
11. ábra: Az occludin mennyiségi változásai az agyi endotélsejtekben nikotin hatására

A sejteket 10 nM - 100 μM koncentrációjú nikotinnal kezeltük 15 és 60 percig, valamint 5 (A) és 24 órán (B) keresztül. A 24 órás kezelések eredményeit a jobb áttekinthetőség miatt denzitometráltuk (C). A bemutatott képek három független kísérlet reprezentánsai. A grafikonok három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolják.

Ezek után a többi sejtkapcsoló fehérjét is hasonlóképpen vizsgáltuk meg. A ZO-1 esetében tapasztalt eltérések hasonlóak voltak az occludinéhoz. A fehérje mennyisége már az 5 órás, magas koncentrációjú (10 μM) nikotin kezelés hatására csökkent a sejtekben, a változás 24 óra elteltével még kifejezettebb volt (12/A ábra). Ugyanakkor az adherens kapcsolatok transzmembrán eleme, a cadherin mennyisége csak hosszabb idő elteltével (24 óra) csökkent (12/B ábra). A β-catenin, a cadherin kölcsönható partnerének kifejeződését egyik nikotin kezelés sem befolyásolta (12/C ábra).

Megfigyeléseink szerint tehát a nikotin csak a dohányos vérében mértnél jóval magasabb koncentrációkban befolyásolja a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződését. A nikotin ilyen magas koncentrációkban történő alkalmazását a patkányok kisebb érzékenységén túl az is indokolja továbbá, hogy a hosszabb idejű, kisebb koncentrációjú vizsgálatok, amelyek jobban közelítenék az *in vivo* körülményeket, a tenyészetek előregedése miatt *in vitro* nem megvalósíthatóak. Az általunk használt nikotin koncentrációkat továbbá a szakirodalom is

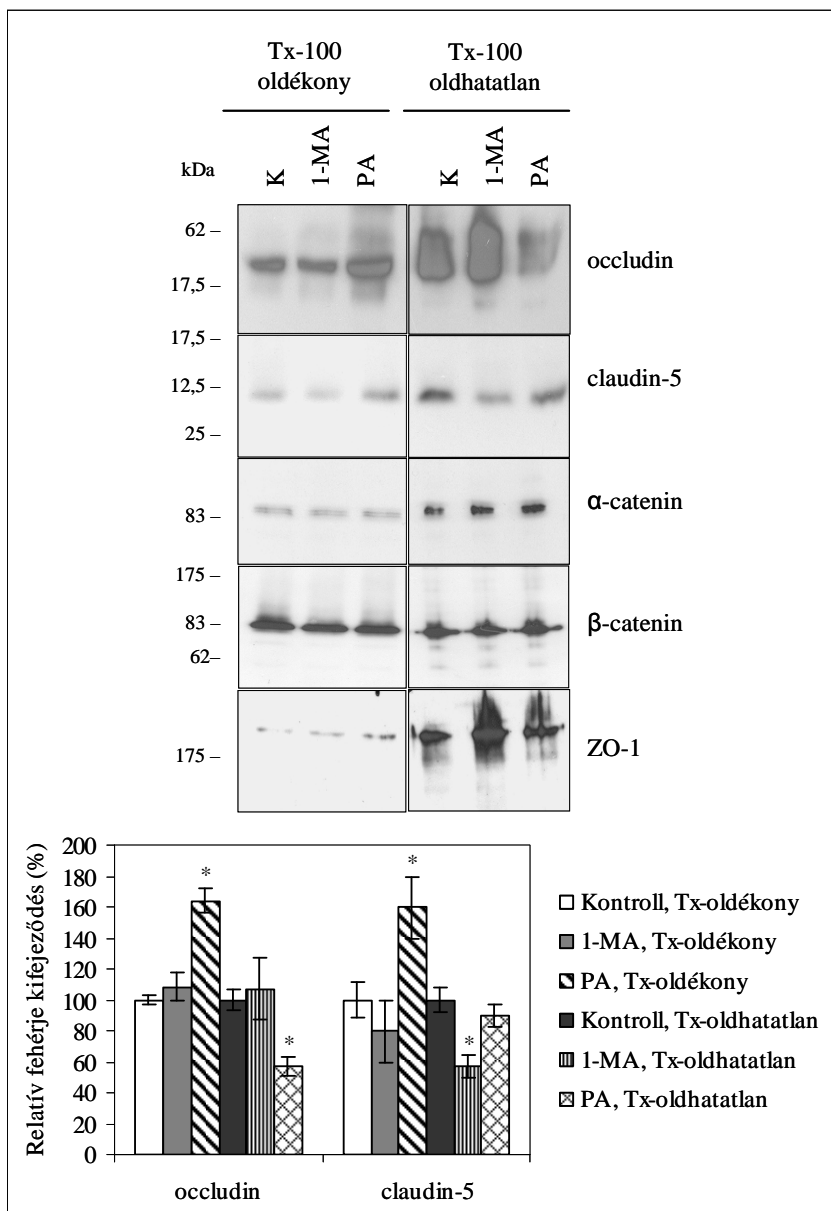
széles körben alkalmazza (Cucina és mtsai, 2000, Dunckley és Lukas, 2003, Kuhlmann és mtsai, 2005, valamint Kanda és Watanabe, 2007).



12. ábra: A ZO-1, a cadherin és a β-catenin mennyiségi változásai nikotin kezelés hatására

A sejteket 1-10 μM koncentrációjú nikotinnal kezeltük 5 és 24 órán át, majd Western blottal vizsgáltuk a sejtkapcsoló fehérjék mennyiségi változásait. Az ábrán három független Western blot kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak. Az egyes fehérje sávok intenzitását denzitometráltuk és a β-cateninhez normalizáltuk. A grafikon három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A statisztikailag szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

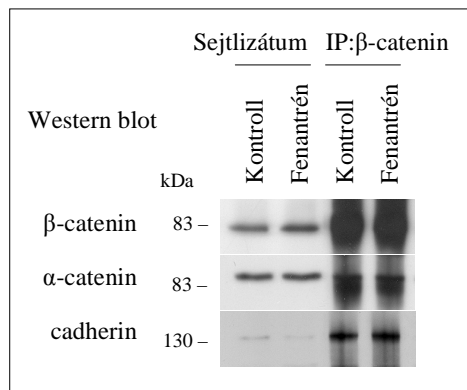
A cigarettafüstben található policiklusos aromás szénhidrogének közül a fenantrén és az 1-metilantracén hatásait vizsgáltuk, mivel ezekről a vegyületekről ismert, hogy károsíthatják az endotélsejteket, ugyanakkor az irodalmi adatok nem agyi eredetű endotélsejtekből származnak. Jelenleg nem áll rendelkezésünkre információ arra vonatkozóan, hogy milyen koncentrációban találhatók e policiklusos aromás szénhidrogének a dohányosok vérében, ezért egy, a szakirodalomnak megfelelő koncentráció (Rummel és mtsai, 1999, valamint Vinggaard és mtsai, 2000), konkrétan 30 μM alkalmazása mellett döntöttünk. Vizsgálatainkat 24 órás kezelésekkel végeztük, mivel a nikotin esetében ennyi idő elteltével tapasztaltuk a legkifejezettebb változásokat. A fenantrén hatására az occludin átrendeződött a Triton X-100 oldhatatlan frakcióból az oldékony frakcióba. Hasonló, de kevésbé kifejezett változásokat tapasztaltunk a claudin-5 esetében is, ebben az esetben statisztikailag szignifikáns eltérés csak az oldékony frakcióban volt. Az α-catenin, a β-catenin és a ZO-1 fehérjék esetében viszont hatástalannak bizonyult a fenantrén kezelés. Az 1-metilantracén (szintén 30 μM, 24 óra) nem változtatta meg a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződését, kivéve a claudin-5 mennyiségének kismértékű csökkenését a Triton X-100 oldhatatlan frakcióban (13. ábra).



13. ábra: A sejtkapcsoló fehérjék mennyiségi változásai fenantrén és 1-metilantracén hatására
A konfluens agyi endotél tenyészeteket fenantrénnel (PA) és 1-metilantracénnel (1-MA) kezeltük (30 μ M, 24 óra). Az ábrán három független Western blot kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak. Az egyes fehérje sávok intenzitását denzitometráltuk és a β -cateninhez normalizáltuk. A grafikon három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A statisztikailag szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

Mivel a két aromás szénhidrogén közül a fenantrén hatásai bizonyultak erőteljesebbnek, ugyanakkor az adherens kapcsolatok alkotóelemeinek mennyisége nem csökkent a kezelése hatására, kíváncsiak voltunk, hogy vajon a fehérjék egymással való kölcsönhatásait megváltoztatja-e ez a vegyület. Az adherens kapcsolatok fehérjeinek egymással való kapcsolatait immunkicsepással vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják,

hogy a fenantrén kezelés nem befolyásolja a cadherin és az α -catenin mennyiségét a β -catenin antitesttel kicsapott mintákban. Ez arra utal, hogy a vegyület nem volt hatással az adherens kapcsolatok ezen elemeinek egymással való kölcsönhatásaira sem (14. ábra).

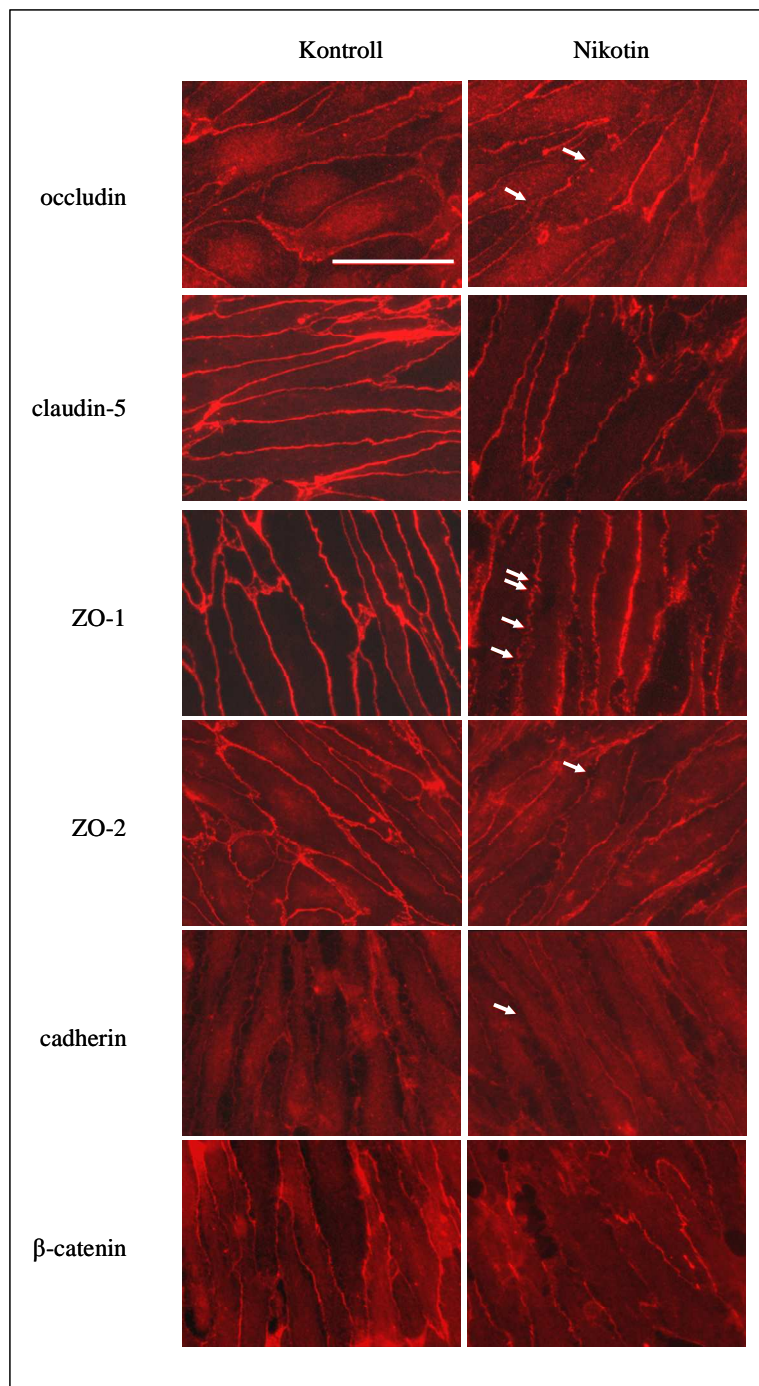


14. ábra: A fenantrén hatása a β -catenin α -cateninnel és cadherinnel alkotott kapcsolataira

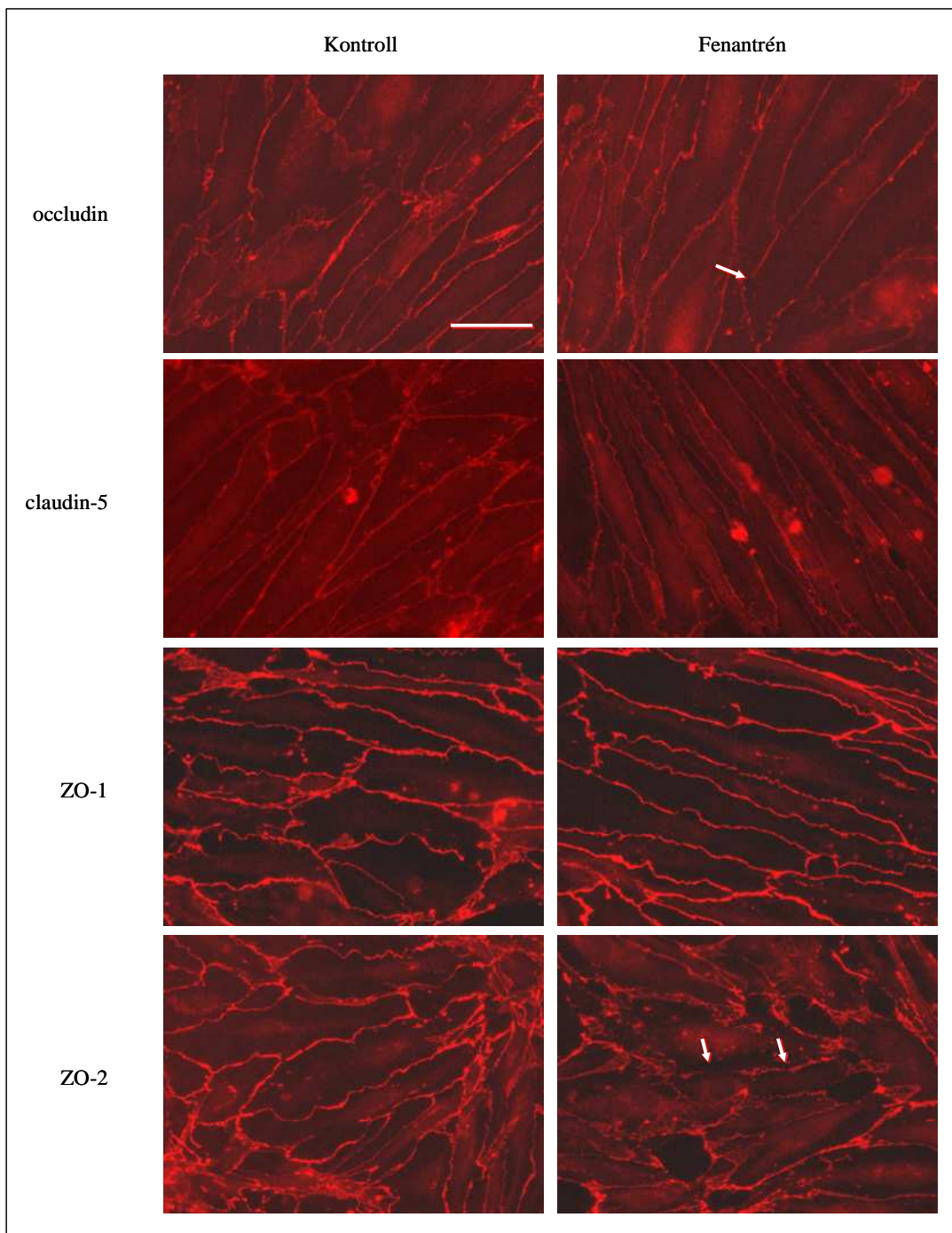
Az agyi endotélsejteket 30 μ M fenantrénnel kezeltük 24 órán át. Az immunkicsapást β -catenin elleni antitesttel végeztük és az így kapott mintákon α -catenin és cadherin antitestekkel Western blot kísérleteket végeztünk.

A sejtkapcsoló fehérjék sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata

A szoros és adherens kapcsolatok alkotóelemeinek mennyiségi elemzésén túl a fehérjék sejten belüli elrendeződését is megvizsgáltuk. A már említett vegyületeket az immunfloreszcens kísérletek során olyan koncentrációban alkalmaztuk, amelyeknél a legnagyobb hatást tapasztaltuk a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződését illetően. A 10 μ M-os, 24 órás nikotin kezelés a legerősebb változásokat a ZO-1 elhelyezkedésében okozta, a fehérje számos helyen eltűnt a sejtek határáról. Hasonló, de kisebb mértékű változásokat tapasztaltunk az occludin, a ZO-2 és a cadherin esetében is. Ugyanakkor a kezelések nem változtatták meg a claudin-5 és a β -catenin sejten belüli elhelyezkedését (15. ábra). A 30 μ M fenantrénnel történt 24 órás kezelések nem okoztak jelentős változásokat a ZO-1 és a claudin-5 esetében, az occludin és a ZO-2 viszont néhány helyen eltűnt a sejt-sejt kapcsolatok területéről (16. ábra).



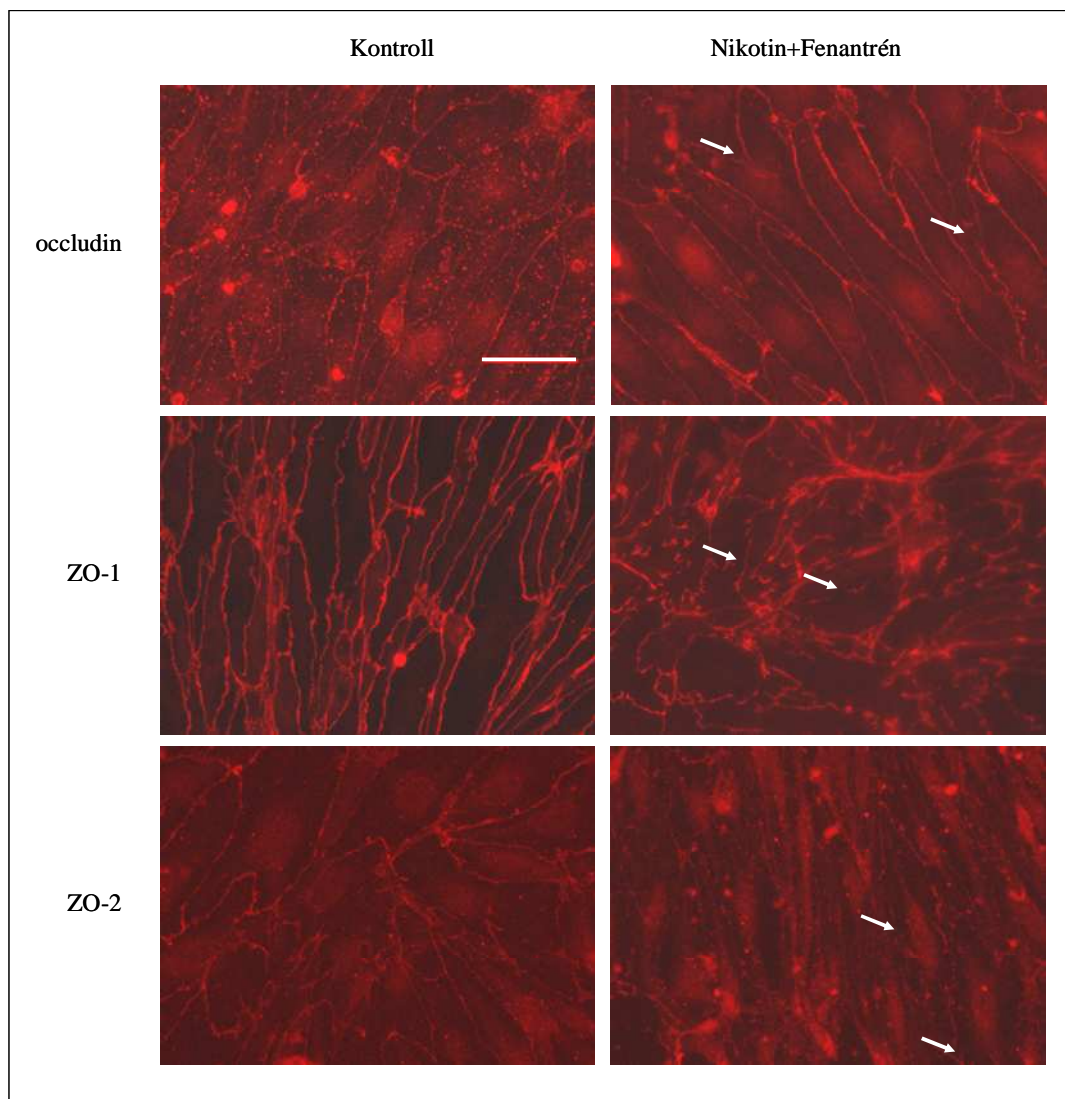
15. ábra: A nikotin hatása a sejt-sejt kapcsolatok alkotóelemeinek sejten belüli elhelyezkedésére
 Az agyi endotélsejtek konfluens tenyészetét 10 μ M nikotinnal kezeltük 24 órán át, és a rögzített sejteket occludin, claudin-5, ZO-1, ZO-2, cadherin és β -catenin elleni antitesttel festettük. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a fehérjék eltűntek a sejt-kapcsoló szerkezetek területéről. Mércse=100 μ m.



16. ábra: A fenantrén hatása a sejt-sejt kapcsolatok alkotóelemeinek sejten belüli elhelyezkedésére
A sejteket 30 μM fenantrénnel kezeltük 24 órán át és a rögzítést követően occludin, claudin-5, ZO-1, valamint ZO-2 elleni antitesttel festettük. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a fehérjék eltűntek a sejt-kapcsoló szerkezetek területéről. Mércse=100 μm .

Mivel e vegyületek a dohányosok vérében nem külön-külön, hanem egyszerre jelennek meg, így a valós körülményeket jobban modellezi, ha a nikotint és a policiklusos aromás szénhidrogéneket együtt alkalmazzuk. A nikotin és a fenantrén együttes hatására a

ZO-1 membránfestése jól láthatóan gyengült és szakadozottá is vált, a ZO-2 és az occludin pedig néhány helyen eltűnt a sejtkapcsoló szerkezetek területéről (17. ábra). E változások hasonlóak voltak a nikotin kezelés esetében megfigyeltékhez.



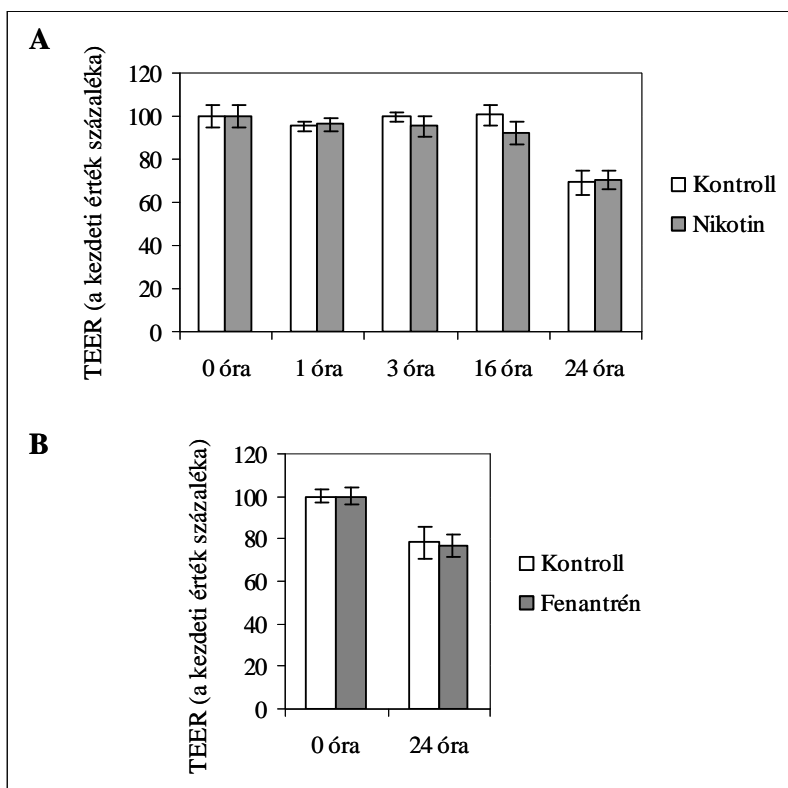
17. ábra: A sejtkapcsoló fehérjék sejten belüli átrendeződése nikotin és fenantrén együttes hatására
A sejteket 10 μ M nikotin és 30 μ M fenantrén keverékével kezeltük 24 órán át, majd rögzítés után occludin, ZO-1 és ZO-2 elleni antitesttel festettük. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a fehérjék eltűntek a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Mércse=100 μ m.

Az endotélsejtek gát funkciójának vizsgálata a transzendenteliális elektromos ellenállás mérésével

Mivel eredményeink alapján a vizsgált vegyületek hatására megváltozik a sejt-sejt kapcsolatok szerkezete, megvizsgáltuk, hogy e változások miként hatnak az endotélsejtek

gát funkciójára. Az ellenállás mérésekhez az agyi endotélsejteket asztrociták jelenlétében tenyésztettük olyan tápfolyadékban, amely fiziológiás koncentrációban tartalmazott hidrokortizont és cAMP-t is. E modell segítségével átlagosan 200-300 Ohm x cm²-es ellenállási értékeket mutattak a konfluens endotél tenyészetek, míg a legmagasabb mért értékek 600 Ohm x cm² körüliek voltak.

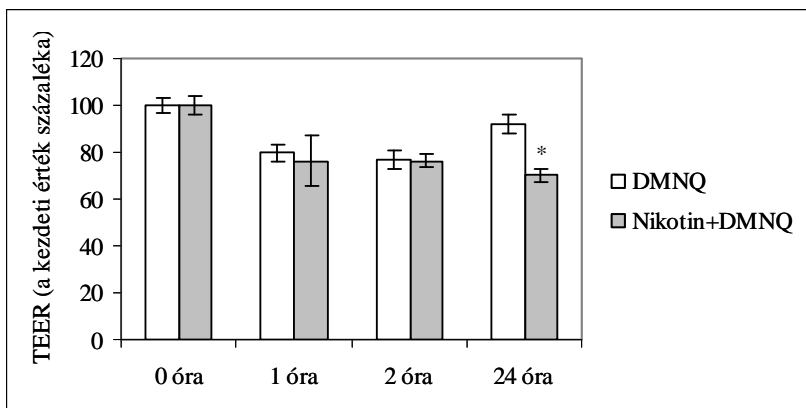
A vizsgálatokhoz azt a legkisebb nikotin koncentrációt alkalmaztuk, amelynél már változásokat tapasztaltunk a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződését illetően. Az endotél tenyészet luminális oldalához 10 µM-os koncentrációban adtunk nikotint a tápfolyadékhoz, majd bizonyos idő (1, 3, 16 és 24 óra) elteltével mértük a tenyészetek elektromos ellenállását. A nikotin hatására egyik időpontban sem tapasztaltunk szignifikáns mértékű ellenállás csökkenést (18/A ábra). Hasonló eredményt kaptunk a fenantrén (30 µM, 18/B ábra), az 1-metilntracén és a kombinált nikotin+fenantrén kezelést követően is (be nem mutatott eredmények).



18. ábra: A nikotin és a fenantrén hatásai az endotélsejtek transzendoteliális elektromos ellenállására
A konfluens tenyészeteket 24 órán át kezeltük nikotinnal (10 µM), valamint fenantrénnel (30 µM) és különböző időpontokban mértük a transzendoteliális elektromos ellenállást. A grafikon három független kísérlet eredményeinek relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja.

A nikotin és az oxidatív stressz együttes hatása az agyi endotélsejtekre

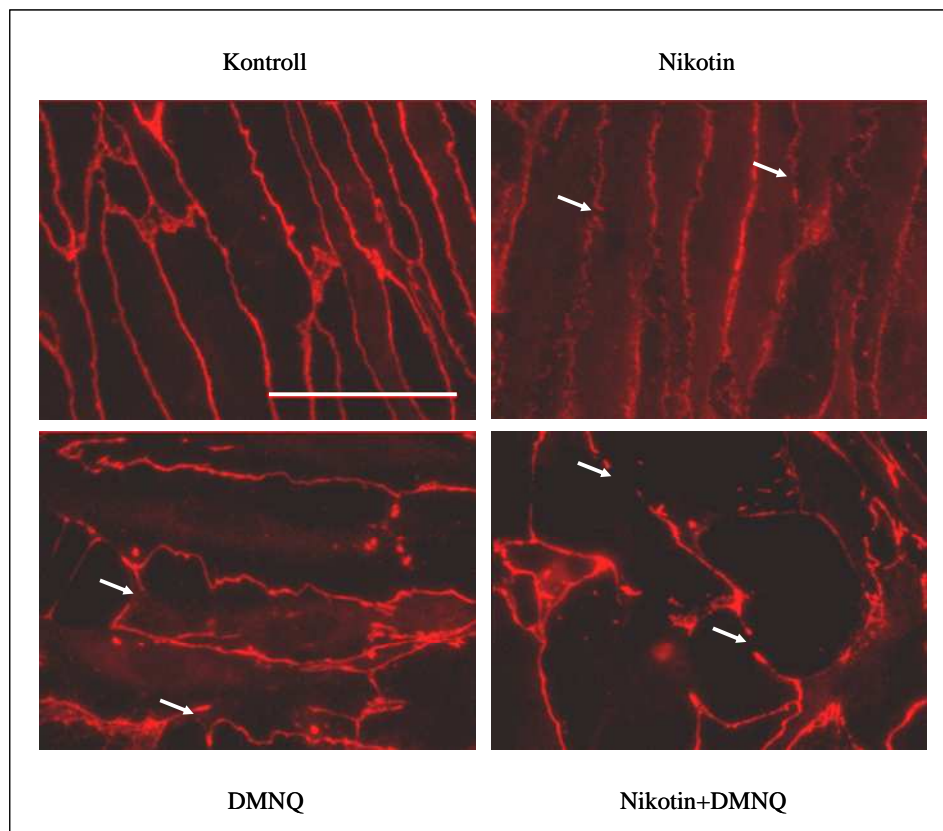
A cigarettafüst számos oxidánst tartalmaz, amelyek vizes oldatban is stabilak maradnak és a tüdő légólyagocskáinak falán keresztül a vérbe juthatnak (Yamaguchi és mtsai, 2007). Emiatt a dohányosok esetében a nikotinéhoz gyakran az oxidatív stressz hatásai is hozzáadódnak. Mivel pedig ismert, hogy az oxidatív stressz negatívan befolyásolja az endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságait (Krizbai és mtsai, 2005), a nikotin és az oxidatív stressz együttes hatásainak vizsgálata közelebb vihet annak megértéséhez, hogy a dohányfüst összetevői milyen módon károsítják a vér-agy gátat. A 24 órás, 10 μM -os koncentrációjú nikotin kezelést szintén 10 μM DMNQ-val kombináltuk, aminek hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a tenyészetek ellenállási értékeit illetően (19. ábra).



19. ábra: A nikotin oxidatív stresszel kombinált hatása az agyi endotélsejtekre

A konfluens tenyészeteket DMNQ-val (10 μM), valamint nikotin (10 μM) és DMNQ keverékével, 24 órán át kezeltük és különböző időpontokban mértük az agyi endotél tenyészetek transzendoteliális elektromos ellenállását. A grafikon három független kísérlet eredményeinek relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja, a szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

A folyamat hátterében lejátszódó változásokat vizsgálva immunfluoreszcens mikroszkópiával kimutattuk, hogy a ZO-1 fehérje membránfestésében még erőteljesebb változásokat eredményezett a kettős kezelés, mint önmagában a DMNQ vagy a nikotin (20. ábra).



20. ábra: A nikotin és az oxidatív stressz együttes hatásai a ZO-1 sejten belüli elhelyezkedésére
A sejteket 10 μ M koncentrációban nikotinnal és DMNQ-val kezeltük 24 órán át, majd a rögzítés után ZO-1 elleni antitesttel festettük. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a fehérje eltűnt a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Mércse=100 μ m.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A központi idegrendszer energiafelhasználása igen nagy: agyunk tömege ugyanis a testtömegünk csupán 2%-át teszi ki, de a szervezet teljes oxigénfogyasztásának 20%-a, míg a glükóz felhasználásának 25%-a esik rá (Clark és Sokoloff, 1999). Az agy tápanyag- és energiaellátásának biztosítására igen kiterjedt kapilláris hálózat áll rendelkezésre: az átlagos távolság a kapillárisok között mintegy 40 μm (Duvernoy és mtsai, 1983), így bár némi túlzással ugyan, de kijelenthetjük, hogy majdnem minden idegsejtnek saját kapillárisa van. Az idegsejteket azonban a folyamatos tápanyag- és energiaellátáson túl a vérben keringő számos, számukra toxikus vegyülettől meg is kell védeni. E kettős feladat ellátását biztosítja a vér-agy gát, amelynek alapját az egymással szorosan illeszkedő agyi kapilláris endotélsejtek alkotják. Ezek a sejtek az asztrocitákkal és a pericitákkal szorosan együttműködve szabályozzák a keringés és a központi idegrendszer közötti anyagáramlást. A gát funkció kialakítása szempontjából kulcsszereppel bírnak az endotélsejtek között kialakuló szoros és adherens kapcsolatok, amelyek sérülése a vér-agy gát permeabilitásának növekedését eredményezi (Wolburg és Lippoldt, 2002).

Ismert tény, hogy patológias körülmények között (gyulladásos betegségek, agyi ischaemia és a véráramlás azt követő helyreállása (reperfúzió), krónikus neurodegeneratív betegségek, agyi tumorok, traumák) megnőhet a vér-agy gát permeabilitása, ami a központi idegrendszer homeosztázisának megbomlásához vezet, és súlyosbíthatja a betegségek lefolyását. A különböző fertőzések gyakran társulnak szisztémás tünetekkel, amelyek szintén károsíthatják a vér-agy gátat. Az endotélsejtek a keringés és a központi idegrendszer határfelületének aktív részeseiként számos stresszfactor hatásának vannak kitéve. Ezen anyagok felismerésében és a válaszreakció elindításában az endotélsejtek Toll-szerű receptorai is szerepet játszhatnak.

Az agyi endoteliális TLR-ek fiziológias szerepéről azonban igen kevés adat áll rendelkezésünkre. A központi idegrendszer immunprivilegizált területnek tekinthető, mivel agyunk nem rendelkezik nyirokkeringéssel, a vér-agy gát pedig fiziológias körülmények között igen erősen korlátozza az immunsejtek és a proinflammatorikus citokinek, kemokinek bejutását a központi idegrendszerbe. Éppen ezért az agyi endotélsejtek egyik feladata lehet, hogy a perifériás immunválasz és a központi idegrendszer közti kapcsolat létrejöttét segítsék. E folyamatban néhány közlemény tanúsága szerint az agyi endoteliális Toll-szerű receptoroknak is fontos szerepe lehet. Inoue és munkatársai 2002-ben kimutatták, hogy az intraperitoneálisan beadott LPS specifikusan az agyszövet

endotélsejtjeiben indukálta a prosztaglandin E2 termelését, amelynek kinetikája összefüggést mutatott az LPS által kiváltott láz időbeni lefutásával. Gosselin és Rivest 2008-ban közölt eredményei alapján az agyi endotélsejtokban a prosztaglandin E2 termeléséhez szükséges a MyD88, a Toll-szerű receptorok egyik univerzális jeltovábbító eleme. Az intraperitoneálisan beadott IL-1 β hatására a MyD88 hiányos agyi endotélsejtakkal rendelkező állatokban a vad típusúakkal ellentétben nem indult meg a prosztaglandin E2 termelése és a hipotalamusz-adenohipofízis-mellékvesekéreg tengely sem aktiválódott.

A szervezetbe jutó kórokozókkal az érfal endotélsejtjei gyakran elsőként találkoznak. A Toll-szerű receptorok feladata egyrészt a patogén mikrobiális ágensek felismerése és a lokális gyulladásos válaszreakció beindítása, citokinek, kemokinek termelésén keresztül a leukociták „hívása”. Ismeretes, hogy az immunsejtek agyi kapilláris endotélsejtkekhez való adhézióját és átjutását az LPS (egy specifikus TLR4 ligand) elősegíti (De Vries és mtsai, 1994, valamint Persidsky és mtsai, 1997), emellett citokinek, prosztaglandinok és egyéb anyagok szekrécióját is fokozza agyi endotélsejtkekben (Vadeboncoeur és mtsai, 2003, valamint McGuire és mtsai, 2003). E receptoroknak az agyi endotélsejtkek sejtkapcsoló szerkezeteire gyakorolt hatásának molekuláris részleteiről mindeztáig csupán néhány közlemény jelent meg (Veszélka és mtsai, 2007, valamint Singh és mtsai, 2007).

Doktori értekezésemben részletezett első kísérletsorozatunk célja az volt, hogy bepillantást nyerjünk a Toll-szerű receptoroknak a vér-agy gát patológiás működésében betöltött szerepébe. Ennek érdekében először is megvizsgáltuk, hogy mely TLR-ek fejeződnek ki a primér patkány agyi endotélsejtteken és egy humán agyi endotélsejt vonal (hCMEC/D3) sejtjein. Adataink szerint a kezeletlen humán sejtkek a TLR2, 3, 4 és 6 mRNS-ek vannak jelen. Hasonló eredményt kaptunk az izolált patkány sejtkek vizsgálata során is, ebben az esetben ugyanakkor a TLR4-et nem sikerült kimutatnunk. Eredményeink egybecsengenek a korábbi irodalmi adatokkal, miszerint a patkány agyi endotélsejtkek alapesetben nem fejeznek ki kimutatható mennyiségű TLR4 mRNS-t, a gén transzkripciója azonban specifikus liganddal indukálható (Singh és Jiang, 2004). A TLR3 és 4 humán agyi endotélsejtkekben való kifejeződését pedig már korábban is leírták (Fischer és mtsai, 2009, Aoki és mtsai, 2010). Az irodalmi adatok szerint egér eredetű agyi endotéliumban továbbá a TLR9 is jelen van (Constantin és mtsai, 2004), mi azonban e receptor jelenlétét jelen kísérleti körülmények között sem patkány, sem pedig humán sejtteken nem észleltük.

Tudomásunk szerint ugyanakkor elsőként írtuk le, hogy az agyi endotélsejtek a már említett receptorokon kívül a TLR6-ot is kifejezik.

Az agyi oxigénhiányos állapot és a vérellátási hiányosság igen komoly szerkezeti és funkcionális károsodásokat képes okozni a központi idegrendszerben. Agyunk legsérülékenyebb sejtjei az idegsejtek, ugyanakkor egyre több az adat arra vonatkozóan, hogy az agyi endotélsejtekre is hatással van a hypoxia, és e sejteknek fontos szerepe van a hypoxiás és ischaemiás változások kórfejlődésében. A főként az ischaemiás periódust követően, a véráramlás helyreállása során felszabaduló oxigén-szabadgyökök szerepe jelentős a hypoxia és ischaemia által kiváltott károsodásban (McCord és Roy, 1982 és Granger, 1988). A központi idegrendszeri betegségeket tekintve a Toll-szerű receptoroknak lényeges szerepe lehet az ischaemiás stroke során bekövetkező patológiás elváltozások közvetítésében: TLR2 és TLR4 hiányos egerek esetében a betegség modellezése során lényegesen kisebb mértékű központi idegrendszeri károsodást tapasztaltak, mint a vad típusú egereknél (Tang és mtsai, 2007). Egy agyi ischaemiás egérmódelben kimutatták, hogy a TLR2, 4 és 9 mRNS-ének kifejeződése jelentősen megnövekszik a központi idegrendszerben, ezek közül a TLR2 jelenlétét endotélsejtekben is kimutatták (Ziegler és mtsai, 2007). A TLR-ek azonban nemcsak hypoxia, de oxigén többlet esetén is aktiválódhatnak. Fulladást követően 100% oxigénnel történő újraélesztés során a 21%-os oxigénnel történő újraélesztéshez képest a TLR2 és TLR4 mRNS kifejeződése növekszik az agyban (Markus és mtsai, 2007). Úgy tűnik tehát, hogy a Toll-szerű receptoroknak fontos szerepe van az oxidatív stresszhatások által kiváltott központi idegrendszeri patológiás folyamatok közvetítésében.

A szakirodalmat áttekintve joggal feltételeztük, hogy a Toll-szerű receptorok az agyi endotélsejtekben is szerepet játszhatnak az oxidatív stressz által kiváltott sejtkárosító hatások közvetítésében. Az oxidatív stressz számos központi idegrendszeri betegség során hozzájárul az endotélsejtek funkciózavarához, ami súlyosbíthatja a betegségek lefolyását (Lum és Roebuck, 2001), éppen ezért igen fontos tisztázni az oxidatív stressz által kiváltott molekuláris folyamatokat. A kérdés tisztázásának érdekében egy olyan vegyületet alkalmaztunk, amely széles körben használatos az irodalomban oxidatív stressz kiváltására. A DMNQ ugyanis a sejtekbe jutva reaktív oxigén gyökök termelődését eredményezi, a vegyületet csoportunk korábbi munkája során már sikeresen alkalmazta agyi endotélsejteken (Krizbai és mtsai, 2005). Kísérleti adataink szerint az ezen vegyülettel kiváltott oxidatív stressz hatására mind a négy azonosított Toll-szerű receptor génjének átírása jelentős mértékben indukálódik a sejtekben, a legnagyobb hatást a TLR6 esetében

figyeltük meg. Eredményeink főként azon ismeretek tükrében lehetnek fontosak, miszerint a reaktív oxigén gyökök az egyik fő okozói az endotélsejtek működési zavarának (Lagrange és mtsai, 1999 és Wu és mtsai, 1998), és az oxidatív stressz kromoszomális aberrációt és apoptózist is indukálhat e sejtekben (Bresgen és mtsai, 2003). Az endotélsejtek kóros működése ugyanis hozzájárul a vér-agy gát sérüléséhez, ami pedig agyödéma kialakulását eredményezheti (Chan és mtsai, 1984). A szakirodalmi adatok (Park és mtsai, 1999, valamint Fischer és mtsai, 2002) és csoportunk korábbi eredményei (Krizbai és mtsai, 2005) alapján az endotélsejtek sejtkapcsoló szerkezetei közvetlenül érintve vannak az oxidatív stressz által kiváltott sérülésekben. Annak vizsgálata, hogy az azonosított agyi endoteliális Toll-szerű receptorok szerepet játszanak-e az oxidatív stressz által kiváltott, a sejtkapcsoló szerkezeteket érintő károsodásokban, jelenleg is folyik laboratóriumunkban.

Mivel elsőként azonosítottuk a 6-os típusú Toll-szerű receptort agyi endotélsejteken, továbbá ismert tény, hogy a specifikus ligandok befolyásolják a Toll-szerű receptorok mRNS szintű kifejeződését (Faure és mtsai, 2001, valamint Singh és Jiang, 2004), ezért megvizsgáltuk, hogy egy specifikus TLR6 agonista, a zymosan miképpen befolyásolja a különböző Toll-szerű receptorok transzkripcióját. A zymosan a vártan megfelelően jelentősen indukálta a TLR2 és 6 gének átírását (mivel ezek a receptorok heterodimert képeznek egymással), míg a többi receptor transzkripciójára nem volt hatással.

Irodalmi adatok alapján ismert volt számunkra, hogy több specifikus TLR agonista, így a lipopoliszacharid és a lipoteikolsav is növeli az endotélsejt tenyészetek permeabilitását, ami a vér-agy gát tulajdonságok károsodását jelzi (Veszeka és mtsai, 2007, valamint Singh és mtsai, 2007). Éppen ezért megvizsgáltuk, hogy a zymosan általi TLR aktivációnak milyen hatása van az agyi endotélsejtekre. Eredményeink alapján e specifikus TLR2/6 agonista is növeli a tenyészetek transzendoteliális permeabilitását, vagyis hatására sérül a gát funkció.

Lévén az endotélsejtek szoros és adherens kapcsolatainak szerepe meghatározó a permeabilitás szabályozásában, ezért a transzendoteliális permeabilitás növekedésének hátterét kutatva a sejtkapcsoló fehérjékre fókuszáltunk. Kimutattuk, hogy a szoros kapcsolatok két transzmembrán alkotóelemének, az occludinnak és a claudin-5-nek a kifejeződése is szignifikánsan csökkent a sejtekben, és a fehérjék eltűntek a junkciók területéről. Ez a jelenség magyarázhatja a korábban megfigyelt permeabilitás növekedést.

A következő lépésként azokat a jeltovábbító útvonalakat kívántuk azonosítani, amelyek a Toll-szerű receptoroktól a sejtkapcsoló szerkezetekig vezetnek. Eredményeink alapján a TLR jeltovábbítás központi elemének, az NF- κ B transzkripciós faktornak a gátlása (PDTC) nem akadályozza meg a sejtkapcsoló fehérjék esetében bekövetkezett változásokat. Ugyanakkor az ERK1/2 kinázok gátlószere, az U0126 segítségével teljes mértékben kivédtük a zymosan occludinra kifejtett hatását. A claudin-5-nél bekövetkező változásokra ez a gátlószer is hatástalannak bizonyult. Valószínűleg más mechanizmusok játszanak szerepet a zymosan e fehérjére kifejtett hatásainak közvetítésében. Ezen folyamatok tisztázására irányuló kísérletek jelenleg is folynak laboratóriumunkban. Az ERK1/2 gátlószer claudin-5 esetében tapasztalt hatástalansága viszont megmagyarázhatja, hogy a vegyület miért nem volt képes megakadályozni a zymosan hatására bekövetkezett permeabilitás növekedést (be nem mutatott eredmény). Számos adat utal ugyanis arra, hogy nem az occludin, hanem a claudin fehérjék képezik az endoteliális szoros kapcsolatok gerincét. Ezt a feltételezést támasztják alá azok az eredmények is, miszerint occludin génkiűtött egerek ép szoros kapcsolatok kialakítására képesek (Saitou és mtsai, 2000). Ezzel ellentétben a claudin-5 hiányos egerek esetében a vér-agy gát permeabilitása kis molekulású anyagokra nézve növekszik (Nitta és mtsai, 2003). A claudin-5 továbbá egér L fibroblaszt sejtekbe juttatva olyan szoros kapcsolatok létrejöttét eredményezte, amelyek hasonlóak voltak az endotélsejtek esetében *in vivo* körülmények között megfigyelhetőkéhez (Morita és mtsai, 1999).

Az oxidatív stressz gyakori velejárója a fertőzéseknek, mivel több baktérium termel szabadgyököket, sőt az aktivált immunsejtek is használják ezeket a molekulákat a kórokozók eltávolítására (Hoffmann és mtsai, 2006, valamint Forman és Torres, 2002). Az oxidánsok jelenlétében e sejtek fokozottan reagálnak a Gram-negatív és -pozitív baktériumokra, illetve a TLR4, TLR2/1 TLR2/6, Nod1 és Nod2 receptorok ligandjaira (Paul-Clark és mtsai, 2008). Ezen ismeretek és saját eredményeink - miszerint az oxidatív stressz növeli a TLR6 kifejeződését – arra engednek következtetni, hogy az oxidatív stressz hozzájárulhat a zymosan hatásához, miáltal még jobban elősegítheti az endotélsejtek működési zavarának kialakulását. E feltevés igazolásának érdekében megvizsgáltuk, hogy a zymosan és a DMNQ együttesen vajon fokozottan hat-e az endoteliális permeabilitásra. Eredményeink szerint a kettős kezelés a zymosan esetében tapasztaltnál képest még jobban növelte a transzendoteliális permeabilitást. A jelenség hátterében álló folyamatokat vizsgálva kimutattuk továbbá, hogy a kombinatív kezelés hatására az occludin mennyisége még inkább csökken a sejtekben. Ezen adatok

bizonyítják, hogy az oxidatív stressz valóban növeli a zymosan hatását, s az endotélsejtek gát funkciójának fokozott károsodását eredményezi. Jelenleg azonban még nem tisztázott, hogy az oxidatív stressz miként erősíti a zymosan hatását.

Oxidatív stresszt szervezetünkben a kórokozókön kívül számos más exogén anyag is kiválthat. E stresszfaktorok között a gyakoriságot tekintve egyre előkelőbb helyet foglalnak el a dohányfüst összetevői. Minden lélegzetvételnyi cigarettafüst 10^{15} számú szabadgyököt tartalmaz (Pryor és Stone, 1993), emiatt a dohányosok igen komoly oxidatív stressznek teszik ki szervezetüket, és a környezeti dohányfüst sem kevésbé ártalmas, mint az aktív dohányzás.

A dohányzás egészségre gyakorolt káros hatásaink igen kiterjedt a szakirodalma. Az Egészségügyi Világszervezet 2008-ban kiadott tanulmánya szerint manapság az emberiség első számú gyilkosa a dohányzás, a 8 legmagasabb halálozási számmal rendelkező betegség közül 6 esetében is bizonyított kockázati tényezőnek számít.

A dohányzás számos agyi érrendszeri megbetegedés egyik fő kockázati tényezője, így jelentősen növeli az agyi véráramlási zavarok, az agylágyulás, illetve az agyvérzés esélyét is (Gállego és mtsai 2007, valamint Shinton és Beevers, 1989). Mindezen ismeretek ellenére is épp csak bepillantást nyerhetünk a dohányfüst összetevőinek az agyi érhalózat endotélsejtjeire gyakorolt hatásába, mivel igen kevés közlemény foglalkozik e témával.

A vér-agy gát alkotóelemeiként az agyi endotélsejtek jelentik az első célpontot az agyat befolyásoló anyagok, így például a tüdőn keresztül a véráramba jutott cigarettafüst összetevők, mint a nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének esetében is. Doktori értekezésemben tárgyalt második kísérletsorozatunk célja annak vizsgálata volt, hogy miképpen hatnak ezek a vegyületek az agyi endotélsejtekre. A kísérletek során a szoros és adherens kapcsolatokra fókuszáltunk, mivel ezek épsége döntően meghatározza a vér-agy gát permeabilitását.

A rövidebb idejű (15 perc-5 óra) nikotin kezelések nem voltak hatással a szoros kapcsolatok egyik fontos transzmembrán alkotóeleme, az occludin kifejeződésére. Ugyanakkor a 24 órás, viszonylag nagy koncentrációjú kezelés hatására csökkent az occludin, a cadherin, és elsősorban a ZO-1 mennyisége is a sejtekben. Western blot eredményeinket az immunfluoreszcens kísérletek is alátámasztották: a ZO-1 bizonyult a nikotin hatásaira legérzékenyebb fehérjének. Hasonló adatokat közöltek már korábban nikotin-kezelt patkányok agyi mikroereinek, illetve primér marha mikroér endotélsejtek vizsgálata során is (Abbruscato és mtsai, 2002, valamint Hawkins és mtsai, 2004). Mivel a nikotin a dohányosok szervezetében számos más vegyülettel egyszerre fordul elő, a valós

körülményeket jobban megközelítendő, a nikotin és a fenantrén együttes hatásait is megvizsgáltuk. A két anyaggal történt kombinatív kezelés viszont nem erősítette fel a nikotin által kiváltott, a fehérjék elhelyezkedésében bekövetkező változásokat.

Eredményeink arra utalnak, hogy a nikotin csak viszonylag magas koncentrációban képes szerkezeti változásokat előidézni az agyi endotélsejtek között kialakuló kapcsolatokban. Csak a dohányosok vérében mért maximális értéknél (600 nM) (Henningfield és mtsai, 1993) is nagyobb koncentrációban volt képes a nikotin hatni a sejtkapcsoló fehérjék kifejeződésére. E viszonylag magas nikotin koncentrációk alkalmazását ugyanakkor indokolja az, hogy a patkányok sokkal ellenállóbbak a nikotin mérgezéssel szemben, mint az emberek, továbbá az alkalmazott *in vitro* modellrendszer csak viszonylag rövid ideig (max. 24 óra) teszi lehetővé a nikotin kezelése hatásainak figyelemmel kísérését. Emiatt a kis koncentrációjú, hosszabb távú vizsgálatok ezen körülmények között nem megvalósíthatók. Az alkalmazott magas nikotin koncentrációjú kezelések széles körben elterjedtek továbbá a szakirodalomban is (Cucina és mtsai, 2000, Dunckley és Lukas, 2003, Kuhlmann és mtsai, 2005, valamint Kanda és Watanabe, 2007), és az ismert citotoxikus koncentrációt (több, mint 1 mM) (Booyse és mtsai, 1981) messze nem érték el.

A nikotin hatására tapasztalt változások nem eredményezték a transzendenteliális elektromos ellenállás statisztikailag szignifikáns mértékű csökkenését. Eredményeink egybeesnek a korábban közölt, marha agyi endotélsejteken kapott adatokkal, miszerint a 12-24 órás nikotin/kotinin kezelésnek nem volt hatása az elektromos ellenállásra normális oxigénellátás (normoxia) mellett (Abbruscato és mtsai, 2002). Egy *in vivo* tanulmányban továbbá kimutatták, hogy a nikotin csak toxikus koncentrációban (100 μ M-1 mM) volt képes növelni a 70 kDa-os a fluorescein-5-izotiocianát (FITC)-dextrán esetében mért permeabilitást (Schilling és mtsai, 1992).

A nikotin sejtkapcsoló szerkezetek fehérjéire kifejtett hatása sokkal kifejezettebb, ha a kezelést DMNQ által kiváltott oxidatív stresszel kombináljuk, amely modell jobban közelíti a dohányosok szervezetében lejátszódó folyamatokat. Csoportunk korábbi eredményei és a szakirodalom is bizonyítja, hogy az oxidatív stressz befolyásolja a sejtkapcsoló szerkezetek épségét (Witt és mtsai, 2003, valamint Krizbai és mtsai, 2005). A DMNQ kezeléshez képest kifejezettebb, statisztikailag szignifikáns mértékű ellenállás csökkenést tapasztaltunk a vegyület nikotinnal való együttes alkalmazásakor, ami arra utal, hogy a nikotin és az oxidatív stressz hatása egymást erősíti. A jelenség hátterében morfológiai változások állnak: a ZO-1 membránfestése még jobban megváltozott a két

vegyület kombinációja, mint önmagában a nikotin vagy a DMNQ hatására. Eredményeink azt sugallják, hogy a nikotin a hypoxiás betegek állapotát a vér-agy gátra kifejtett hatásain keresztül súlyosbíthatja. Adataink alátámasztják a korábban Abbruscato és mtsai által közölt eredményeket (2002 és 2004), miszerint a nikotin és a hypoxia/aglikémia (a vércukor hiánya) egymást erősítve hatnak a vér-agy gát permeabilitására és a kálium transzportra.

A nikotin ezen hatásait valószínűleg a nikotinos acetilkolin receptorokon keresztül fejt ki, amelyek $\alpha 3$, 5, 7, és $\beta 2$ alegységeit azonosították már agyi endotélsejteken (Abbruscato és mtsai, 2002, valamint Hawkins és mtsai, 2005). Ugyanakkor olyan mechanizmusok is szerepet játszhatnak a nikotin által kiváltott endoteliális sejtkárosodásokban, amelyek nem e receptorok közvetítésével zajlanak (Tonnessen és mtsai, 2000).

A nikotin természetesen nem az egyetlen olyan dohányfüst összetevő, amely károsíthatja az agyi endotélsejteket. Legjobb tudomásunk szerint azonban a policiklusos aromás szénhidrogének agyi endotélsejtekre kifejtett hatásait még senki sem vizsgálta. Más szövetek endotélsejtjein végzett tanulmányok viszont a sejtek sérüléséről tanúskodnak. Az említett vegyületeknek kitett humán szívkoszorúér endotélsejtek ugyanis fontos változásokat mutattak: a vegyületek hatására aktiválódott a PLA2 (foszfolipáz A2) a sejtekben, valamint zsírsavak szabadultak fel, és apoptózis is bekövetkezett (Tithof és mtsai, 2002). Humán aorta endotélsejtekben az említett vegyületekben gazdag cigarettafüst kondenzátum hatására az interleukin 4 és 8 termelődése indukálódott, ami a sejtek sérülésére utal (Nordskog és mtsai, 2005). Még nagyrészt ismeretlenek azok a mechanizmusok, amelyeken keresztül ezek a szénhidrogének kifejtik hatásukat az endotélsejteken, de a policiklusos aromás szénhidrogén (PAH) receptorok fontos szerepet játszhatnak ezekben a folyamatokban (van Grevenynghe és mtsai, 2006).

A nikotin mellett két policiklusos aromás szénhidrogén, a fenantrén és az 1-metilantracén szoros és adherens kapcsolatokra kifejtett hatásait is megvizsgáltuk. A fenantrén hatására az occludin és a claudin-5 átrendeződött a Triton X-100 oldékony frakcióból, míg az 1-metilantracén a claudin-5 mennyiségét csökkentette kissé az oldhatatlan frakcióban. A fenantrén hatására továbbá az occludin és a ZO-2 néhány helyen eltűnt a sejt-sejt kapcsolatok területéről. Az adherens kapcsolatok fehérjéinek mennyiségére ugyanakkor egyik vegyület sem volt hatással, emellett a fenantrén a β -catenin cadherinnel és α -cateninnel való kölcsönhatását sem befolyásolta. Akárcsak a nikotin, úgy a fenantrén hatására sem csökkent a tenyészetek elektromos ellenállását, ami

arra utal, hogy a jelenlegi vizsgálati körülmények között e policiklusos aromás szénhidrogénnek önmagában nem volt számottevő hatása az endotélsejtek gát funkciójára.

A dohányfüst egyes összetevői, a nikotin, a fenantrén, valamint az 1-metilantracén agyi endotélsejtekre kifejtett hatásait célzó összetett vizsgálataink eredményei összességében arra utalnak, hogy a cigarettafüst e komponensei valószínűleg nem okoznak akut változásokat az agyi endotélsejtek alapvető funkcionális tulajdonságaiban. A vegyületeknek való 24 órás kitettség főként más károsító hatásokkal, így oxidatív stresszel együttesen viszont jelentősen befolyásolhatja a vér-agy gát működését. Eredményeink fontos információval szolgálnak a dohányzással kapcsolatos kockázatok becsléséhez különböző központi idegrendszeri betegségekkel, mint például az agyi ischaemiával kapcsolatban.

Összességében elmondhatjuk, hogy eredményeink révén bepillantást nyerhettünk az agyi endotélsejtek Toll-szerű receptorai által közvetített folyamatokba, illetve a dohányfüst egyes összetevői által kiváltott endoteliális funkciózavarokba is. Munkánk során természetesen számos újabb kérdés merült fel, amelyek megválaszolása a következő évek feladata. Reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak a gyulladásos folyamatokhoz társuló vér-agy gát sérülések kivédésére irányuló új gyógyszercélpontok azonosításához, amelyek több központi idegrendszeri megbetegedés megelőzését, illetve kezelését segíthetik. Ugyanakkor munkánk felhívja a figyelmet a dohányfüst legfontosabb alkotóelemeinek agyi endotélsejtekre gyakorolt közvetlen hatására, aminek különös jelentősége lehet más károsító tényezőkkel (például ischaemia) való együttes jelenlét esetén.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Krizbai Istvánt, az MTA SZBK Biofizikai Intézetének tudományos főmunkatársát, aki egyetemi hallgató korom óta töretlen türelemmel és bizalommal támogatja munkámat, s akinek nemcsak szakmai, de az élet más területein adott tanácsaira is bátran támaszkodhattam.

Köszönettel tartozom Dr. Siklós Lászlónak és Dr. Párdutz Árpádnak az MTA SZBK Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium jelenlegi és volt vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben doktori munkám elvégzését.

Köszönet illeti a Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium minden jelenlegi és volt tagját a segítőkészségükért.

Név szerint is köszönettel tartozom továbbá az Agyi Endotél Kutatócsoport jelenlegi és volt tagjainak, elsősorban Dr. Wilhelm Imolának és Dr. Farkas E. Attilának, továbbá Fazakas Csillának, Haskó Jánosnak, Ngo Thi Kue Dungnak, Dr. Pilaiwanwadee Hutamekalinnak, valamint Dr. Orbók Annának munkám kezdetén az alkalmazott technikák elsajátításában nyújtott segítségükért, a további évek során pedig önzetlen támogatásukért, hasznos tanácsaikért és nem utolsósorban az inspiráló, vidám és kellemes légkörért, amit nemcsak a munkahelyen, de a laboron kívül is fenntartottak.

Köszönet a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak az anyagi támogatásért munkám befejezéséhez.

Örök hálával tartozom szüleimnek és testvéremnek, amiért egész életem során mindenben támogattak és mindig hagyták, hogy a saját utamat járjam.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott, N. J.** (1992). Comparative physiology of the blood–brain barrier. Bradbury, M. W. B. (szerk.) *Physiology and Pharmacology of the Blood–Brain Barrier*, Springer-Verlag, Heidelberg, 371–396.
- Abbott N.J.** (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 5-23.
- Abbott N.J., Patabendige A.A., Dolman D.E., Yusof S.R., Begley D.J.** (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13-25.
- Abbott N.J., Rönnbäck L., Hansson E.** (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41-53.
- Abbruscato T.J., Lopez S.P., Mark K.S., Hawkins B.T., Davis T.P.** (2002). Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells. *J. Pharm. Sci.* 91, 2525-2538.
- Abbruscato T.J., Lopez S.P., Roder K., Paulson J.R.** (2004). Regulation of blood-brain barrier Na,K,2Cl-cotransporter through phosphorylation during in vitro stroke conditions and nicotine exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 459-468.
- Akira S., Hemmi H.** (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85, 85-95.
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Amacher DE.** (2006). Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective. *Curr. Drug Metab.* 3, 219-229.
- Anastasiadis P.Z., Reynolds A.B.** (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J. Cell Sci.* 113, 1319-1334.
- Anderson K.V., Bokla L., Nüsslein-Volhard C.** (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.
- Aoki T., Nishimura M., Ishibashi R., Kataoka H., Takagi Y., Hashimoto N.** (2010). Toll-like receptor 4 expression during cerebral aneurysm formation. *J. Neurosurg.* 113, 851-858.
- Aronow W.S.** (1973). Editorial: Smoking, carbon monoxide, and coronary heart disease. *Circulation* 48, 1169-1112.

- Aurrand-Lions M.A., Duncan L., Ballestrem C., Imhof B.A.** (2001). JAM-2, a novel Immunoglobulin Superfamily Molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 2733-2741.
- Balda M.S., Whitney J.A., Flores C., González S., Cereijido M., Matter K.** (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134, 1031-1049.
- Banerjee A., Gerondakis S.** (2007). Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol. Cell Biol.* 85, 420-424.
- Banks WA.** (2009). Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol.* 9, Suppl. 1:S3.
- Barnoya J., Glantz S.A.** (2005). Cardiovascular effects of secondhand smoke: nearly as large as smoking. *Circulation* 111, 2684-2698.
- Barton G.M., Kagan J.C., Medzhitov R.** (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 7, 49-56.
- Bautsch V.L., James J.M.** (2009). Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell. Adh. Migr.* 3, 199-204.
- Belkhadir Y., Subramaniam R., Dangl J.L.** (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 391-399.
- Ben-Ze'ev A., Geiger B.** (1998). Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 629-639.
- Bernacki J., Dobrowolska A., Nierwińska K., Małecki A.** (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Rep.* 60, 600-622.
- Booyse F.M., Osikowicz G., Radek J.** (1981). Effect of nicotine on cultured bovine aortic endothelial cells. *Thromb. Res.* 23, 169-185.
- Bratt A., Birot O., Sinha I., Veitonmäki N., Aase K., Ernkvist M., Holmgren L.** (2005). Angiotensin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility. *J. Biol. Chem.* 280, 34859-34869.
- Bresgen N., Karlhuber G., Krizbai I., Bauer H., Bauer H.C., Eckl P.M.** (2003). Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberrations, micronuclei, and apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 72, 327-333.
- Brightman M.W., Reese T.S.** (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell. Biol.* 40, 648-677.

- Brightman, M. W.** (1992). Ultrastructure of brain endothelium. Bradbury, M. W. B. (szerk.) Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier, Springer-Verlag, Heidelberg, 1-22.
- Bsibsi M., Persoon-Deen C., Verwer R.W., Meeuwssen S., Ravid R., Van Noort J.M.** (2006). Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia* 53, 688-695.
- Chan P.H., Schmidley J.W., Fishman R.A., Longar S.M.** (1984). Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* 34, 315-320.
- Chen, J.L., Wei, L., Bereczki, D., Hans, F.J., Otsuka, Y., Acuff, V., Gherzi-Egea, J.F., Patlak, C., Fenstermacher, J.D.** (1995). Nicotine raises the influx of permeable solutes across the rat blood-brain barrier with little or no capillary recruitment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15: 687-698.
- Chen Y., Merzdorf C., Paul D.L., Goodenough D.A.** (1997). COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J. Cell Biol.* 138, 891-899.
- Chung SW, Lee JH, Choi KH, Park YC, Eo SK, Rhim BY, Kim K.** (2009). Extracellular heat shock protein 90 induces interleukin-8 in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 444-449.
- Citi S., Sabanay H., Jakes R., Geiger B., Kendrick-Jones J.** (1988). Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 333, 272-276.
- Clark, D.D. Sokoloff L.** (1999). Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. ed. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Philadelphia: Lippincott, 637–670.
- Cohen M.P., Frank R.N., Khalifa A.A.** (1980). Collagen production by cultured retinal capillary pericytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 90-94.
- Cohen R.M., Andreason P.J., Doudet D.J., Carson R.E., Sunderland T.** (1997a). Opiate receptor avidity and cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 148, 171-180.
- Cohen Z., Molinatti G., Hamel E.** (1997b). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 894-904.

- Conklin B.S., Zhao W., Zhong D.S., Chen C.** (2002). Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 160, 413-418.
- Constantin D., Cordenier A., Robinson K., Ala'Aldeen D.A., Murphy S.** (2004). Neisseria meningitidis-induced death of cerebrovascular endothelium: mechanisms triggering transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* 89, 1166-1174.
- Conti-Fine B.M., Navaneetham D., Lei S., Maus A.D.** (2000). Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur. J. Pharmacol.* 393, 279-294.
- Cucina A., Sapienza P., Borrelli V., Corvino V., Foresi G., Randone B., Cavallaro A., Santoro-D'Angelo L.** (2000). Nicotine reorganizes cytoskeleton of vascular endothelial cell through platelet-derived growth factor BB. *J. Surg. Res.* 92, 233-238.
- de Vries H.E., Moor A.C., Blom-Roosemalen M.C., de Boer A.G., Breimer D.D., van Berkel T.J., Kuiper J.** (1994). Lymphocyte adhesion to brain capillary endothelial cells in vitro. *J. Neuroimmunol.* 52, 1-8.
- Dehouck M.P., Méresse S., Delorme P., Fruchart J.C., Cecchelli R.** (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* 54, 1798-1801.
- Dejana E.** (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 98, 1949-1953.
- del Zoppo G.J., Hallenbeck J.M.** (2000). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 98, 73-81.
- Delaloye J., Roger T., Steiner-Tardivel Q.G., Le Roy D., Knaup Reymond M., Akira S., Petrilli V., Gomez C.E., Perdiguero B., Tschopp J., Pantaleo G., Esteban M., Calandra T.** (2009). Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 5, e1000480.
- Doll R.** (1998). Uncovering the effects of smoking: historical perspective. *Stat. Methods Med. Res.* 7, 87-117.
- Drees F., Pokutta S., Yamada S., Nelson W.J., Weis W.I.** (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123, 903-915.

- Dunckley T., Lukas R.J.** (2003). Nicotine modulates the expression of a diverse set of genes in the neuronal SH-SY5Y cell line. *J. Biol. Chem.* 278, 15633-15640.
- Duvernoy H., Delon S., Vannson J.L.** (1983). The vascularization of the human cerebellar cortex. *Brain Res. Bull.* 11, 419-480.
- Farhat K., Riekenberg S., Heine H., Debarry J., Lang R., Mages J., Buwitt-Beckmann U., Röschmann K., Jung G., Wiesmüller K.H., Ulmer A.J.** (2008). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J. Leukoc. Biol.* 83, 692-701.
- Farkas A., Szatmári E., Orbók A., Wilhelm I., Wejksza K., Nagyoszi P., Hutamekalin P., Bauer H., Bauer H.C., Traweger A., Krizbai I.A.** (2005). Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. *J. Neurosci. Res.* 80, 855-861.
- Faure E., Thomas L., Xu H., Medvedev A., Equils O., Arditi M.** (2001). Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 166, 2018-2024.
- Fehér A., Deli M.A., Szabó-Révész P.** (2007). A vér-agy gát szerepe, felépítése és gyógyszerészeti vonatkozásai. *Gyógyszerészet* 51, 85-91.
- Fischer S., Wobben M., Marti H.H., Renz D., Schaper W.** (2002). Hypoxia induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc. Res.* 63, 70-80.
- Fischer S., Nishio M., Peters S.C., Tschernatsch M., Walberer M., Weidemann S., Heidenreich R., Couraud P.O., Weksler B.B., Romero I.A., Gerriets T., Preissner K.T.** (2009). Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB J.* 23, 2100-2109.
- Forman H.J., Torres M.** (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 15, 166(12 Pt 2):S4-8.
- Frank C.W., Weinblatt E., Shapiro S., Sager R.V.** (1966). Myocardial infarction in men. Role of physical activity and smoking in incidence and mortality. *J. Am. Med. Assoc.* 198, 1241-1245.
- Fratiglioni L., Wang H.X.** (2000). Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav. Brain Res.* 113, 117-120.

- Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S.** (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777-1788.
- Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S.** (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539-1550.
- Gállego J., Martínez Vila E., Muñoz R.** (2007). Patients at high risk for ischemic stroke: identification and actions. *Cerebrovasc. Dis.* 24, 49-63.
- Gill R., Tsung A., Billiar T.** (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1121-1132.
- Goldstein G.W., Betz A.L.** (1986). The blood-brain barrier. *Sci. Am.* 255, 74-83.
- González-Mariscal L., Tapia R., Chamorro D.** (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 729-756.
- Gordon S.** (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930.
- Gosselin D., Rivest S.** (2008). MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation. *Mol. Psychiatry.* 13, 480-497.
- Gosselin R.E.** (1988). *Clinical toxicology of Commercial Products*. VI.ed Baltimore, Williams & Wilkins: 311-313.
- Granger D.N.** (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 255, 1269-1275.
- Guan Y., Ranoa D.R., Jiang S., Mutha S.K., Li X., Baudry J., Tapping R.I.** (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J. Immunol.* 184, 5094-5103.
- Gumbiner B., Lowenkopf T., Apatira D.** (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3460-3464.
- Gutteridge J.M.** (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819-1828.
- Halimi J.M., Giraudeau B., Vol S., Cacès E., Nivet H., Tichet J.** (2002). The risk of hypertension in men: direct and indirect effects of chronic smoking. *J. Hypertens.* 20, 187-193.
- Hallman M., Rämet M., Ezekowitz R.A.** (2001). Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr. Res.* 50, 315-21.

- Hamel E.** (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol.* 100, 1059-1064.
- Hankey G.J.** (1999). Smoking and risk of stroke. *J. Cardiovasc. Risk.* 6, 207-211.
- Harris B.Z., Lim W.A.** (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.* 114, 3219-3231.
- Haseloff R.F., Blasig I.E., Bauer H.C., Bauer H.** (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 25-39.
- Haskins J., Gu L., Wittchen E.S., Hibbard J., Stevenson B.R.** (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* 141, 199-208.
- Hatsukami D.K., Stead L.F., Gupta P.C.** (2008). Tobacco addiction. *Lancet* 371, 2027-2038.
- Hawkins B.T., Abbruscato T.J., Eggleton R.D., Brown R.C., Huber J.D., Campos C.R., Davis T.P.** (2004). Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain Res.* 1027, 48-58.
- Hawkins B.T., Eggleton R.D., Davis T.P.** (2005). Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H212-219.
- Henningfield J.E., Stapleton J.M., Benowitz N.L., Grayson R.F., London E.D.** (1993). Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend.* 33, 23-29.
- Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM.** (2001). Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276, 10423-10431.
- Hoffmann D., Hoffmann I.** (1997). The changing cigarette, 1950-1995. *J. Toxicol. Environ. Health.* 50, 307-364.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A.** (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hoffmann O., Zweigner J., Smith S.H., Freyer D., Mahrhofer C., Dagand E., Tuomanen E.I., Weber J.R.** (2006). Interplay of pneumococcal hydrogen peroxide and host-derived nitric oxide. *Infect. Immun.* 74, 5058-5066.

- Hoheisel D., Nitz T., Franke H., Wegener J., Hakvoort A., Tilling T., Galla H.J.** (1998). Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 312-316.
- Hori S., Ohtsuki S., Hosoya K., Nakashima E., Terasaki T.** (2004). A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J. Neurochem.* 89, 503-513.
- Hou Y.F., Zhou Y.C., Zheng X.X., Wang H.Y., Fu Y.L., Fang Z.M., He S.H.** (2006). Modulation of expression and function of Toll-like receptor 3 in A549 and H292 cells by histamine. *Mol. Immunol.* 43, 1982-1992.
- Ide N., Hata Y., Nishioka H., Hirao K., Yao I., Deguchi M., Mizoguchi A., Nishimori H., Tokino T., Nakamura Y., Takai Y.** (1999). Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. *Oncogene* 18, 7810-7815.
- Ikeda W., Nakanishi H., Miyoshi J., Mandai K., Ishizaki H., Tanaka M., Togawa A., Takahashi K., Nishioka H., Yoshida H., Mizoguchi A., Nishikawa S., Takai Y.** (1999). Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J. Cell Biol.* 146, 1117-1132.
- Inoko A., Itoh M., Tamura A., Matsuda M., Furuse M., Tsukita S.** (2003). Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes Cells* 8, 837-845.
- Inoue W., Matsumura K., Yamagata K., Takemiya T., Shiraki T., Kobayashi S.** (2002). Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci. Res.* 44, 51-61.
- Itoh M., Nagafuchi A., Moroi S., Tsukita S.** (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J. Cell Biol.* 138, 181-192.
- Itoh M., Morita K., Tsukita S.** (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J. Biol. Chem.* 274, 5981-5986.
- Jaimes E.A., DeMaster E.G., Tian R.X., Raij L.** (2004). Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1031-1036.
- Janzer R.C., Raff M.C.** (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257.

- Janeway C.A. Jr., Medzhitov R.** (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jiang, D.J., Jia, S.J., Yan, J., Zhou, Z., Yuan, Q., Li, Y.J.** (2006). Involvement of DDAH/ADMA/NOS pathway in nicotine-induced endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349; 683-693.
- Jin M.S., Lee J.O.** (2008). Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29, 182–191.
- Józan P., Radnóti L.** (2002). A dohányzás hatása a halandóságra Magyarországon 1970-1999. Központi Statisztikai Hivatal, Budapest
- Kanda Y., Watanabe Y.** (2007). Nicotine-induced vascular endothelial growth factor release via the EGFR-ERK pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* 80, 1409-1414.
- Kawai T., Akira S.** (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816-825.
- Kemler, R.** (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9, 317-321.
- Kevil C.G., Oshima T., Alexander J.S.** (2001). The role of p38 MAP kinase in hydrogen peroxide mediated endothelial solute permeability. *Endothelium* 8, 107-116.
- Knudsen K.A., Soler A.P., Johnson K.R., Wheelock M.J.** (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J. Cell Biol.* 130, 67-77.
- Kobielak, A., Fuchs, E.** (2004). α -Catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 614–625.
- Koehler R.C., Gebremedhin D., Harder D.R.** (2006). Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J. Appl. Physiol.* 100, 307-317.
- Koide, M., Nishizawa, S., Yamamoto, S., Yamaguchi, M., Namba, H., Terakawa, S.** (2005). Nicotine exposure, mimicked smoking, directly and indirectly enhanced protein kinase C activity in isolated canine basilar artery, resulting in enhancement of arterial contraction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 292-301.
- Krause G., Winkler L., Mueller S.L., Haseloff R.F., Piontek J., Blasig I.E.** (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 631-645.
- Krizbai I.A., Deli M.A.** (2003). Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 49, 23-31.

- Krizbai I.A., Bauer H., Bresgen N., Eckl P.M., Farkas A., Szatmári E., Traweger A., Wejksza K., Bauer H.C.** (2005). Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 129-139.
- Kuhlmann C.R., Scharbrodt W., Schaefer C.A., Most A.K., Backenköhler U., Neumann T., Tillmanns H., Waldecker B., Erdogan A., Wiecha J.** (2005). Discordant effects of nicotine on endothelial cell proliferation, migration, and the inward rectifier potassium current. *J. Mol. Cell Cardiol.* 38, 315-322.
- Kumar H, Kawai T, Akira S.** (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 621-625.
- Kurth, T., Kase, C.S., Berger, K., Schaeffener, E.S., Buring, J.E., Gaziano, M.** (2003). Smoking and the risk of hemorrhagic stroke. *Stroke* 34: 1151-1155.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagrange P., Romero I.A., Minn A., Revest P.A.** (1999). Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 667-672.
- Lai C.H., Kuo K.H.** (2005). The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res. Brain Res Rev.* 50, 258-265.
- Latorre I.J., Roh M.H., Frese K.K., Weiss R.S., Margolis B., Javier R.T.** (2005). Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118, 4283-4293.
- Laura R.P., Ross S., Koeppen H., Lasky L.A.** (2002). MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein. *Exp. Cell Res.* 275, 155-170.
- Laviolette S.R., van der Kooy D.** (2004). The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 55-65.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M, Hoffmann J.A.** (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Liu Y., Nusrat A., Schnell F.J., Reaves T.A., Walsh S., Pochet M., Parkos C.A.** (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* 113, 2363-2374.
- Lum H., Roebuck K.A.** (2001). Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, 719-741.

- Macklin K.D., Maus A.D., Pereira E.F., Albuquerque E.X., Conti-Fine B.M.** (1998). Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 435-439.
- Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S.** (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 29-38.
- Mancuso M.R., Kuhnert F., Kuo C.J.** (2008). Developmental angiogenesis of the central nervous system. *Lymphat. Res. Biol.* 6, 173-180.
- Mandarino L.J., Sundarraj N., Finlayson ., Hassell H.R.** (1993). Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp. Eye Res.* 57, 609-621.
- Markus T., Hansson S., Amer-Wählin I., Hellström-Westas L., Saugstad O.D., Ley D.** (2007). Cerebral inflammatory response after fetal asphyxia and hyperoxic resuscitation in newborn sheep. *Pediatr. Res.* 62, 71-77.
- Martindale J.L., Holbrook N.J.** (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol.* 192, 1-15.
- Martín-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., Dejana E.** (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117-127.
- Matter K., Balda M.S.** (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 225-236.
- McAllister M.S., Krizanac-Bengez L., Macchia F., Naftalin R.J., Pedley K.C., Mayberg M.R., Marroni M., Leaman S., Stanness K.A., Janigro D.** (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* 904, 20-30.
- McCord J.M., Roy R.S.** (1982). The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1346-1352.
- McGuire T.R., Trickler W.J., Hock L., Vrana A., Hoie E.B., Miller D.W.** (2003). Release of prostaglandin E-2 in bovine brain endothelial cells after exposure to three unique forms of the antifungal drug amphotericin-B: role of COX-2 in amphotericin-B induced fever. *Life Sci.* 72, 2581-2590.
- Medzhitov R., Janeway C.A. Jr.** (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Misra A., Ganesh S., Shahiwala A., Shah S.P. (2003). Drug delivery to the central nervous system: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 252-273.

Mitic L.L., Van Itallie C.M., Anderson J.M. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, 250-254.

Morita K., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 511-516.

Morita K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 147, 185-194.

Murawski M.R., Bowen G.N., Cerny A.M., Anderson L.J., Haynes L.M., Tripp R.A., Kurt-Jones E.A., Finberg R.W. (2009). Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J. Virol.* 83, 1492-1500.

Nag S. and Begley D.J. (2005). Blood–brain barrier, exchange of metabolites and gases. *Pathology and Genetics. Cerebrovascular Diseases, ISN Neuropath. Press, Basel* pp. 22–29.

Neunteufl, T., Heher, S., Kostner, K., Mitulovic, G., Lehr, S., Khoschsorur, K., Schmid, R.W., Maurer, G., Stefenell, T. (2002). Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 251-256.

Nishimura M., Kakizaki M., Ono Y., Morimoto K., Takeuchi M., Inoue Y., Imai T., Takai Y. (2002). JEAP, a novel component of tight junctions in exocrine cells. *J. Biol. Chem.* 277, 5583-5587.

Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161, 653-660.

Nordskog B.K., Blixt A.D., Morgan W.T., Fields W.R., Hellmann G.M. (2003). Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Cardiovasc. Toxicol.* 3, 101-117.

Nordskog B.K., Fields W.R., Hellmann G.M. (2005). Kinetic analysis of cytokine response to cigarette smoke condensate by human endothelial and monocytic cells. *Toxicology* 212, 87-97.

Ohnishi H., Nakahara T., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., Furuse M. (2004). JACOP, a novel plaque protein localizing at the apical junctional complex with sequence similarity to cingulin. *J. Biol. Chem.* 279, 46014-46022.

Ohtsuki S., Terasaki T. (2007). Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* 24, 1745-1758.

Ohtsuki S., Yamaguchi H., Katsukura Y., Asashima T., Terasaki T. (2008). mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J. Neurochem.* 104, 147-154.

Okamoto M., Kita T., Okuda H., Tanaka T., Nakashima T. (1994). Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 75, 1-6.

Okamura Y., Watari M., Jerud E.S., Young D.W., Ishizaka S.T., Rose J., Chow J.C., Strauss J.F. 3rd. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229-10233.

O'Toole T.E., Conklin D.J., Bhatnagar A. (2008). Environmental risk factors for heart disease. *Rev. Environ. Health* 23, 167-202.

Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13766-13771.

Pal D., Audus K.L., Siahaan, T. J. (1997). Modulation of cellular adhesion in bovine brain microvessel endothelial cells by a decapeptide. *Brain Res.* 747, 103-113.

Park J.H., Okayama N., Gute D., Krsmanovic A., Battarbee H., Alexander J.S. (1999). Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* 277, C1066-C1074.

Patrie KM. (2005). Identification and characterization of a novel tight junction-associated family of proteins that interacts with a WW domain of MAGI-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 131-144.

Paul-Clark M.J., Sorrentino R., Bailey L.K., Sriskandan S., Mitchell J.A. (2008). Gram-positive and Gram-negative bacteria synergize with oxidants to release CXCL8 from innate immune cells. *Mol. Med.* 14, 238-246.

Pawson T., Nash P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-452.

Perrière N., Demeuse P., Garcia E., Regina A., Debray M., Andreux J.P., Couvreur P., Scherrmann J.M., Tamsamani J., Couraud P.O., Deli M.A., Roux F. (2005). Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J. Neurochem.* 93, 279-289.

Persidsky Y., Stins M., Way D., Witte M.H., Weinand M., Kim K.S., Bock P., Gendelman H.E., Fiala M. (1997). A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J. Immunol.* 158, 3499-3510.

Persidsky Y., Ramirez S.H., Haorah J., Kanmogne G.D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 223-236.

Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.

Pryor W.A., Stone K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyhydrate, and peroxyhydrate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 686, 12-27

Pryor W.A., Stone K., Zang L.Y., Bermúdez E. (1998). Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 441-448.

Ranganathan R., Ross E.M. (1997). PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr. Biol.* 7, 770-773.

Raupach T., Schäfer K., Konstantinides S., Andreas S. (2006). Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. *Eur. Heart J.* 27, 386-392.

Reese T.S., Karnovsky M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.* 34, 207-217.

Rehli M. (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol.* 23, 375-278.

Rose J.E., Mukhin A.G., Lokitz S.J., Turkington T.G., Herskovic J., Behm F.M., Garg S., Garg P.K. (2010). Kinetics of brain nicotine accumulation in dependent and nondependent smokers assessed with PET and cigarettes containing ¹¹C-nicotine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 5190-5195.

Rubin L.L., Hall D.E., Porter S., Barbu K., Cannon C., Horner H.C., Janatpour M., Liaw C.W., Manning K., Morales J., Tanner L.I., Tomaselli K.J., and Bard F. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 115, 1725-1735.

Rummel, A.M., Trosko, J.E., Wilson, M.R., Upham, B.L. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intercellular communication and stimulated MAPK activity. *Toxicol. Sci.* 49, 232-240.

Russell M.A, Jarvis M., Iyer R., Feyerabend C. (1980). Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br. Med. J.* 280, 972-976.

Sabha M., Tanus-Santos J.E., Toledo J.C., Cittadino M., Rocha J.C., Moreno H. Jr. (2000). Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 167-174.

Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T., Tsukita S. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.* 141, 397-408

Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Schulzke J.D., Fromm M., Takano H., Noda T., Tsukita S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* 11, 4131-4142.

Savettieri G., Di Liegro I., Catania C., Licata L., Pitarresi G.L., D'Agostino S., Schiera G., De Caro V., Giandalia G., Giannola L.I., Cestelli A. (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport.* 11, 1081-1084.

Scheibner K.A., Lutz M.A., Boodoo S., Fenton M.J., Powell J.D., Horton M.R. (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* 177, 1272-1281.

Schick S., Glantz S. (2005). Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tob. Control.* 14, 396-404.

Schilling L., Bultmann A., Wahl M. (1992). Lack of effect of topically applied nicotine on pial arteriole diameter and blood-brain barrier integrity in the cat. *Clin. Investig.* 70, 210-217.

Schinkel A.H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36,179-194.

Schlageter K.E., Molnar P., Lapin G.D., Groothuis D.R. (1999). Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc. Res.* 58, 312-328.

- Schulze C., Firth J.A.** (1993). Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. *J. Cell Sci.* 104, 773-782.
- Shen Y., Rattan V., Sultana C., Kalra V.K.** (1996). Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am. J. Physiol.* 270, H1624-1633.
- Shi M.M., Kugelman A., Iwamoto T., Tian L., Forman H.J.** (1994). Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 26512-26517.
- Shinton R., Beevers G.** (1989). Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *Br. Med. J.* 298, 789-794.
- Singh A.K., Jiang Y.** (2004). How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology* 201, 197-207.
- Singh A.K., Jiang Y., Gupta S.** (2007). Effects of bacterial toxins on endothelial tight junction in vitro: a mechanism-based investigation. *Toxicol. Mech. Methods.* 17, 331-347.
- Smith C.J., Fischer T.H.** (2001). Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 158, 257-267.
- Snajdar R.M., Busuttil S.J., Averbook A., Graham D.J.** (2001). Inhibition of endothelial cell migration by cigarette smoke condensate. *J. Surg. Res.* 96, 10-6.
- Sobue K., Yamamoto N., Yoneda K., Hodgson M.E., Yamashiro K., Tsuruoka N., Tsuda T., Katsuya H., Miura Y., Asai K., Kato T.** (1999). Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 35, 155-64.
- Soloviev A.I., Tishkin S.M., Parshikov A.V., Ivanova I.V., Goncharov E.V., Gurney A.M.** (2003). Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 138, 837-844.
- Stohs S.J.** (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 6, 205-228.
- Stolerman I.P., Shoaib M.** (1991). The neurobiology of tobacco addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 467-473.
- Sugihara-Mizuno Y., Adachi M., Kobayashi Y., Hamazaki Y., Nishimura M., Imai T., Furuse M., Tsukita S.** (2007). Molecular characterization of angiomin/IEAP family proteins: interaction with MUPP1/Patj and their endogenous properties. *Genes Cells* 12, 473-486.

- Steinberg M.S., McNutt P.M.** (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 554-560.
- Stevenson B.R., Siliciano J.D., Mooseker M.S., Goodenough D.A.** (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103, 755-766.
- Stewart P.A., Wiley M.J.** (1981). Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* 84, 183-192.
- Takeda K., Kaisho T., Akira S.** (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376.
- Takeda K., Akira S.** (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP.** (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13798-13803.
- Thirman, M.J. Albrecht, J.H. Krueger, M.A., Erickson, R.R., Cherwitz, D.L., Park, S.S., Gelboin, H.V., Holtzman, J.L.** (1994). Induction of cytochrome CYP1A 1 and formation of toxic metabolites of benzo[a]pyrene by rat aorta: a possible role in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5397-5401.
- Tithof P.K., Elgayyar M., Cho Y., Guan W., Fisher A.B., Peters-Golden M.** (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause endothelial cell apoptosis by a phospholipase A2-dependent mechanism. *FASEB J.* 16, 1463-1464.
- Tilling T., Engelbertz C., Decker S., Korte D., Hüwel S., Galla H.J.** (2002). Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. *Cell Tissue Res.* 310, 19-29.
- Tonnessen B.H., Severson S.R., Hurt R.D., Miller V.M.** (2000). Modulation of nitric-oxide synthase by nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 601-606.
- Tong X.K., Hamel E.** (1999). Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92, 163-175.
- Tontsch U., Bauer H.C.** (1991). Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 539, 247-253.

- Underhill D.M., Ozinsky A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 103-110.
- Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., da Costa C., Miethke T., Kirschning C.J., Häcker H., Wagner H.** (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31332-31339.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H.** (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 15107-15112.
- Vadeboncoeur N., Segura M., Al-Numani D., Vanier G., Gottschalk M.** (2003.) Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003 35, 49-58.
- van der Vaart H., Postma D.S., Timens W., Ten Hacken N.H.** (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax.* 59, 713-721.
- van Grevenynghe J., Monteiro P., Gilot D., Fest T., Fardel O.** (2006). Human endothelial progenitors constitute targets for environmental atherogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 763-769.
- Vaucher E., Tong X.K., Cholet N., Lantin S., Hamel E.** (2000). GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J. Comp. Neurol.* 421, 161-171.
- Veszeka S., Pásztói M., Farkas A.E., Krizbai I., Ngo T.K., Niwa M., Abrahám CS., Deli M.A.** (2007). Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem. Int.* 50, 219-228.
- Villablanca A.C.** (1998). Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J. Appl. Physiol.* 84, 2089-2098.
- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Larsen, J.C.** (2000). Environment polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology* 145, 173-183.
- Wang H., Ye Y., Zhu M., Cho C.** (2000). Increased interleukin-8 expression by cigarette smoke extract in endothelial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9, 19-23.
- Wang L., McComb J.G., Weiss M.H., McDonough A.A., Zlokovic B.V.** (1994). Nicotine downregulates alpha 2 isoform of Na,K-ATPase at the blood-brain barrier and brain in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1422-1427.

Watabe-Uchida M., Uchida N., Imamura Y., Nagafuchi A., Fujimoto K., Uemura T., Vermeulen S., van Roy F., Adamson E.D., Takeichi M. (1998). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142, 847-857.

Weksler B.B., Subileau E.A., Perrière N., Charneau P., Holloway K., Leveque M., Tricoire-Leignel H., Nicotra A., Bourdoulous S., Turowski P., Male D.K., Roux F., Greenwood J., Romero I.A., Couraud P.O. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 19, 1872-1874.

Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C., Baker B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78, 1101-1115.

Wilhelm I., Farkas A.E., Nagyoszi P., Váró G., Bálint Z., Végh G.A., Couraud P.O., Romero I.A., Weksler B., Krizbai I.A. (2007). Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium. *Phys. Med. Biol.* 52, 6261-6174.

Wilhelm I., Nagyoszi P., Farkas A.E., Couraud P.O., Romero I.A., Weksler B., Fazakas C., Dung N.T., Bottka S., Bauer H., Bauer H.C., Krizbai I.A. (2008). Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. *J. Neurochem.* 107, 116-126.

Witt K.A., Mark K.S., Hom S., Davis T.P. (2003). Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H2820-1831.

Wolburg, H., Lippoldt, A., (2002). Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 38, 323–337.

Wolin M.S. (2000). Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1430-1442.

Wong V., Gumbiner B.M. (1997). A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J. Cell Biol.* 136, 399-409.

World Health Organisation (2008). WHO report on the global tobacco epidemic. World Health Organization Publications

Wu S., Tamaki N., Nagashima T., Yamaguchi M. (1998). Reactive oxygen species in reoxygenation injury of rat brain capillary endothelial cells. *Neurosurgery* 43, 577-583

Yamada S., Pokutta S., Drees F., Weis W.I., Nelson W.J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123, 889-901.

- Yamaguchi Y., Haginaka J., Morimoto S., Fujioka Y., Kunitomo M.** (2005). Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 186-193.
- Yamaguchi Y., Nasu F., Harada A., Kunitomo M.** (2007). Oxidants in the gas phase of cigarette smoke pass through the lung alveolar wall and raise systemic oxidative stress. *J. Pharmacol. Sci.* 103, 275-282.
- Yong T., Zheng M.Q., Linthicum D.S.** (1997). Nicotine induces leukocyte rolling and adhesion in the cerebral microcirculation of the mouse. *J. Neuroimmunol.* 80, 158-164.
- Zhadanov A.B., Provance D.W., Speer C.A., Coffin J.D., Goss D., Blixt J.A., Reichert C.M., Mercer J.A.** (1999). Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Curr. Biol.* 9, 880-888.
- Zhang X., Shan P., Qureshi S., Homer R., Medzhitov R., Noble P.W., Lee P.J.** (2005). Cutting edge: TLR4 deficiency confers susceptibility to lethal oxidant lung injury. *J. Immunol.* 175, 4834-4838.
- Zidovetzki R., Chen P., Fisher M., Hofman F.M., Faraci F.M.** (1999). Nicotine increases plasminogen activator inhibitor-1 production by human brain endothelial cells via protein kinase C-associated pathway. *Stroke* 30, 651-655.
- Ziegler G., Harhausen D., Schepers C., Hoffmann O., Röhr C., Prinz V., König J., Lehrach H., Nietfeld W., Trendelenburg G.** (2007). TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 574-579.

ÖSSZEFOGLALÓ

A központi idegrendszeri homeosztázis megteremtésében és fenntartásában kiemelkedő szerepe van a vér-agy gátnak. A gát morfológiai alapját az egymással szorosan illeszkedő agyi endotélsejtek alkotják, amelyek az asztrocitákkal és a pericitákkal együttműködve szabályozzák a keringés és a központi idegrendszer közötti anyagáramlást. A gát funkció kialakítása szempontjából kiemelkedő szereppel bírnak az endotélsejtek között kialakuló szoros és adherens kapcsolatok, amelyek sérülése a vér-agy gát permeabilitásának növekedését eredményezi.

Ismert tény, hogy patológiás körülmények között (gyulladásos betegségek, agyi vérellátási hiányosság és a véráramlás azt követő helyreállása, krónikus neurodegeneratív betegségek, agyi tumorok, traumák) megnőhet a vér-agy gát permeabilitása, ami a központi idegrendszer homeosztázisának megbomlásához vezet és súlyosbíthatja a betegségek lefolyását. A különböző fertőzések gyakran társulnak szisztémás tünetekkel, amelyek szintén károsíthatják a vér-agy gátat.

Az endotélsejtek a keringési rendszer és az agyszövet határfelületének aktív részeseiként számos stresszfaktor hatásának vannak kitéve. Az agyi endotélsejteken is kifejeződő Toll-szerű receptorok (TLR) a legkülönbözőbb exogén és endogén anyagokat ismerik fel, és gyulladásos válaszreakciókat indítanak be. Kutatásaink célja annak tisztázása, hogy milyen szerepet töltenek be a Toll-szerű receptorok a vér-agy gát patológiás működésében.

Eredményeink alapján egy humán agyi endotélsejt vonal (hCMEC/D3) sejtjei alapesetben a TLR2, 3, 4 és 6, míg izolált patkány agyi endotélsejtek a TLR2, 3 és 6 receptorokat fejezik ki. Az azonosított humán receptorok mindegyikének mRNS szintű kifejeződését indukálta az oxidatív stressz, amit DMNQ kezeléssel váltottunk ki. A TLR2/6 receptorok agonistája, a zymosan pedig e két receptor kifejeződését serkentette, míg a TLR3 és 4-re nem volt hatással. A zymosan továbbá növelte az endotél tenyészetek permeabilitását is. E jelenséget magyarázhatja a zymosan sejt-sejt kapcsolatokra kifejtett hatása: a kezelés eredményeképpen a szoros kapcsolatok két transzmembrán alkotóelemének, az occludinnak és a claudin-5-nek a mennyisége is csökkent a sejtekben és a fehérjék számos helyen eltűntek a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Az occludin esetében bekövetkezett változásokat nem sikerült kivédeni az NF- κ B gátlószerrel (PDTC), viszont az U0126 nevezetű ERK1/2 kináz gátlószerrel igen. A claudin-5 eltűnését PDTC-vel és U0126-tal sem sikerült megakadályozni. Oxidatív stresszel kombinálva a zymosan

még kifejezettebb változásokat okozott: a kettős kezelés hatására fokozódott az occludin mennyiségének csökkenése és a fehérje teljes mértékben eltűnt a szoros kapcsolatok területéről.

Igen komoly oxidatív stressznek teszi ki szervezetünket a dohányfüst is, amelynek számos összetevője képes a véráramon keresztül a legtöbb sejthez eljutni. A cigarettafüstből több ezer vegyület jut a testünkbe, köztük a nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének is. A dohányzáshoz köthető neurológiai betegségekben szenvedők nagy száma arra utal, hogy a dohányfüst összetevőinek egyik fő célpontja a központi idegrendszer. Annak ellenére, hogy a dohányosok körében igen gyakran fordul elő agyi érkatasztrófa, illetve ismeretes az is, hogy a vér-agy gát fontos szerepet tölt be e betegség kórfejlődésében, igen kevés információ áll rendelkezésünkre a dohányzás vér-agy gátra gyakorolt közvetlen hatásáról. Az egyik leginkább vitatott kérdés az, hogy maga a nikotin milyen mértékben járul hozzá a központi idegrendszeri megbetegedések kialakulásához, illetve más dohányfüst összetevők e folyamatokban betöltött szerepe is tisztázatlan.

Munkánk során a dohányfüst néhány olyan alkotóelemét, így a nikotint és két policiklusos aromás szénhidrogént, a fenantrént és az 1-metilantracént is vizsgáltuk. E vegyületek szervezetünkre gyakorolt befolyásának ugyan kiterjedt a szakirodalma, de az agyi endotélsejtekre kifejtett hatásaik alig, vagy egyáltalán nem ismertek. A nikotin esetében Western blottal kimutattuk, hogy a rövidebb idejű, kisebb koncentrációjú kezelések nem voltak hatással az endotélsejtek sejtkapcsoló fehérjéinek kifejeződésére. A vegyület csak a dohányosok vérében mért maximálisnál is nagyobb koncentrációban károsította a sejtkapcsoló szerkezeteket: hatására a szoros kapcsolatokat felépítő egyes komponensei, így ZO-1 és az occludin, valamint az adherens kapcsolatok transzmembrán alkotóeleme, a cadherin mennyisége is csökkent a sejtekben. Az említett fehérjék, valamint a ZO-2 is több helyen eltűnt a sejt-sejt kapcsolatok területéről. A nikotin és a fenantrén együttes hatására is hasonló változásokat tapasztaltunk a sejtkapcsoló fehérjék sejten belüli elhelyezkedését illetően. A nikotin ugyan önmagában nem befolyásolta, de DMNQ-val kombinálva szignifikáns mértékben csökkentette a tenyészetek transzendenteliális elektromos ellenállását, ami az endotélsejtek gát funkciójának sérülésére utal.

A vizsgált két policiklusos aromás szénhidrogén közül a fenantrén hatására a szoros kapcsolatok két transzmembrán fehérjéje, az occludin és a claudin-5 is átrendeződött a Triton X-100 oldékony frakcióból az oldhatatlanba, míg az 1-metilantracén a claudin-5 mennyiségét csökkentette kissé az oldhatatlan frakcióban. A fenantrén hatására továbbá az occludin és a ZO-2 néhány helyen eltűnt a sejt-sejt kapcsolatok területéről. Az adherens

kapcsolatok fehérjéinek mennyiségére ugyanakkor egyik vegyület sem volt hatással, emellett a fenantrén a β -catenin α -cateninnek és cadherinnel való kölcsönhatását sem befolyásolta. Akárcsak a nikotin, így a fenantrén hatására bekövetkezett változások sem csökkentették a tenyészetek elektromos ellenállását, ami arra utal, hogy ezen vizsgálati körülmények között e policiklusos aromás szénhidrogénnek önmagában nem volt számottevő hatása az endotélsejtek gát funkciójára.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a cigarettafüst komponensei valószínűleg nem okoznak akut változásokat az agyi endotélsejtek alapvető funkcionális tulajdonságaiban. Ugyanakkor a vegyületek főként más károsító hatásokkal, így oxidatív stresszel együttvéve jelentősen befolyásolhatják a vér-agy gát működését.

Összességében elmondhatjuk, hogy eredményeink révén bepillantást nyerhettünk az agyi endotélsejtek Toll-szerű receptorai által közvetített folyamatokba, illetve a dohányfüst egyes összetevői által kiváltott endoteliális funkciózavarokba is.

SUMMARY

The blood-brain barrier (BBB) plays a key role in the maintenance of the homeostasis of the central nervous system (CNS). The morphological basis of the BBB is formed by cerebral endothelial cells (CECs) which come in contact with pericytes and astrocytes and restrict free exchanges between the blood and the neural tissue. CECs form a single cell layer lining the blood vessels, and are sealed with a continuous belt of tight junctions. The permeability of the endothelial barrier is largely determined by the integrity of the tight junctions and adherens junctions between endothelial cells.

It is well established that under pathological conditions (e.g., inflammatory disorders, cerebral ischemia and subsequent reperfusion, neurodegenerative disorders, brain tumors, trauma) an increase in BBB permeability may occur, which may lead to a disturbed homeostasis of the CNS with severe consequences. Moreover, infections are often associated with systemic symptoms and may compromise the functional integrity of the BBB as well.

As an active part of the interface between blood and neural tissue the endothelial cells are extremely important in sensing and responding to stress factors. The Toll-like receptors, which are expressed on endothelial cells as well, recognize a broad range of exogenous and endogenous molecules and initiate inflammatory reactions. The goal of our study is to investigate the role of Toll-like receptors in the pathophysiology of the blood-brain barrier.

Our results showed that cells of a human brain endothelial cell line (hCMEC/D3) express TLR2, 3, 4 and 6 while primary rat brain endothelial cells express TLR2, 3 and 6 under basal conditions. The mRNA expression of all identified human Toll-like receptors was induced by oxidative stress caused by DMNQ. Zymosan, a TLR2/6 agonist elevated the expression of these two receptors while having no effect on the expression of TLR3 and 4. Moreover zymosan increased the permeability of the endothelial cell cultures. This phenomenon can be explained by the effect of zymosan on the cell junctions: zymosan treatment resulted in a decrease in occludin and claudin-5 expression and the loss of membrane staining of these two transmembrane components of the tight junctions. U0126, the ERK1/2 kinase inhibitor was able to prevent the changes of occludin caused by zymosan. However neither PTDC (an NF- κ B inhibitor) nor U0126 was able to prevent the decrease of claudin-5 expression. Zymosan combined with oxidative stress had an even

more pronounced effect on the junctions because occludin completely disappeared from the cell contact sites.

Smoking also causes serious oxidative stress load in our body. Many components of tobacco smoke can reach most of the cells through the bloodstream. Thousands of different compounds get into the body with cigarette smoke including nicotine and polycyclic aromatic hydrocarbons. The high number of smokers suffering from neurological disorders shows that one of the main targets of tobacco smoke components is the central nervous system. Despite the high incidence of stroke among smokers and the key role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of this disease very little information is available about the direct effect of smoking on the blood-brain barrier. One of the most controversial issues is the extent of nicotine's contribution to the development of CNS disorders and the role of other tobacco smoke components in these processes.

We investigated the effects of some tobacco smoke components, namely nicotine and two polycyclic aromatic hydrocarbons, phenanthrene and 1-methylanthracene on intercellular junctions of cerebral endothelial cells. Our Western blot studies showed that short treatments with low concentrations of nicotine did not affect the transmembrane proteins of the tight junctions. Only concentrations above peak plasma levels of nicotine led to a decrease in occludin, ZO-1 and cadherin expression, members of the tight and adherens junctions, respectively. Results of the immunofluorescent analysis confirmed Western blot data showing that the most sensitive tight junction protein to nicotine was ZO-1. A similar, but less pronounced effect of nicotine was observed on the localization of occludin, ZO-2 and cadherin. Localization of junctional proteins after a combined nicotine and phenanthrene treatment was comparable to that seen after nicotine treatment alone. Nicotine alone had no effect on the transendothelial electrical resistance of the cell cultures. However combination of nicotine treatment with oxidative stress induced by DMNQ led to a significant decrease in the transendothelial electrical resistance indicating damage of the gate function of endothelial cells.

Phenanthrene treatment caused a redistribution of occludin from the Triton X-100 insoluble to the Triton X-100 soluble fraction. A similar but less pronounced effect was seen in the case of claudin-5. Methylanthracene caused a slight decrease in claudin-5 expression in the Triton X-100 insoluble fraction. Treatment with phenanthrene did not cause significant changes in ZO-1 or claudin-5 localization. In the case of occludin and ZO-2, a slight decrease in the continuity of the staining was detected. Neither phenanthrene nor methylanthracene had effect on adherens junction proteins, moreover phenanthrene did

not cause changes in the β -catenin-cadherin and β -catenin- α -catenin interactions of the adherens junction. Similar to nicotine, phenanthrene alone had no effect on the transendothelial electrical resistance of the cell cultures indicating that this polycyclic aromatic hydrocarbon had no significant effect on the gate function of endothelial cells.

The results of our complex investigation on the effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells suggest that tobacco smoke components do not cause acute alterations in the principal functional properties of the cerebral endothelial cells. However, in combination with other damaging effects like oxidative stress, these cigarette smoke compounds may cause a significantly impaired BBB function.

Taken together, our results give deeper insight into the processes mediated by cerebral endothelial Toll-like receptors and the endothelial damage caused by certain tobacco smoke components.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

Nagyőrszi P., Wilhelm I., Farkas A.E., Fazakas C., Dung N.T., Haskó J., Krizbai I.A. (2010) Expression and regulation of Toll-like receptors in cerebral endothelial cells. Neurochem. Int.

IF₂₀₀₉: 3,541

Hutamekalin P., Farkas A.E., Orbók A., Wilhelm I., **Nagyőrszi P.**, Veszélka S., Deli M.A., Buzás K., Hunyadi-Gulyás E., Medzihradszky K.F., Meksuriyen D., Krizbai I.A. (2008) Effect of nicotine and polycyclic aromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. Cell Biol. Int. 32, 198-209.

IF₂₀₀₈: 1,619

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények:

Wilhelm I., **Nagyőrszi P.**, Farkas A.E., Couraud P.O., Romero I.A., Weksler B., Fazakas C., Dung N.T., Bottka S., Bauer H., Bauer H.C., Krizbai I.A. (2008) Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. J. Neurochem. 107, 116-126.

IF₂₀₀₈: 4,500

Wilhelm I., Farkas A.E., **Nagyőrszi P.**, Váró G., Bálint Z., Végh G.A., Couraud P.O., Romero I.A., Weksler B., Krizbai I.A. (2007) Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium. Phys. Med. Biol. 52, 6261-6174.

IF₂₀₀₇: 2.528

Farkas A., Szatmári E., Orbók A., Wilhelm I., Wejksza K., **Nagyőrszi P.**, Hutamekalin P., Bauer H., Bauer H.C., Traweger A., Krizbai I.A. (2005) Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. J. Neurosci. Res. 80, 855-861.

IF₂₀₀₅: 3.239